Cristian TIGAE
Alexandru POPESCU

METODE DE SEPARARE

METODE DE SEPARARE

Editura Universitaria Craiova

Cristian TIGAE Alexandru POPESCU

METODE DE SEPARARE

METODE DE SEPARARE

Editura Universitaria, CRAIOVA
2007

Referenti ştiinţifici:
Prof.univ.dr. Maria Pleniceanu
Prof.univ.dr. Mircea Preda

Copyright © 2007 Universitaria
Toate drepturile sunt rezervate Editurii Universitaria

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale:

TIGAE, Cristian
POPESCU, Alexandru

METODE DE SEPARARE / Cristian TIGAE, Alexandru POPESCU – Editura Universitaria, 2007 (Tipografia Universităţii din Craiova)
166 p.;
21 cm;
Bibliogr.
ISBN: 973-742-536-7
978-973-742-536-2

Bun de tipar: 10.01.2007
Tipografia Universităţii din Craiova
Str. Brestei, nr.156A, Craiova, Dolj, România
Tel.: +40 251 598054

Tipărit în România

CUPRINS

PREFAȚĂ **1**
1. METODELE DE SEPARARE-PARTE INTEGRANTĂ A CHIMIEI ANALITICE **4**
1.1 NECESITATEA PROCESELOR DE SEPARARE .. 4
1.2 ROLUL FAZELOR 6
1.3 ECHILIBRUL INTERFAZIC 7
1.4 CLASIFICAREA METODELOR DE SEPARARE 11
1.5 MĂSURA EFICIENȚEI UNEI SEPARĂRI 14
2. MECANISME DE SEPARARE **20**
3. SEPARAEA PRIN PRECIPITARE **22**
3.1 SEPARAREA CONSTITUENȚILOR ÎN URME PRIN PRECIPITARE 26
4. SEPARAREA PRIN VOLATILIZARE **29**
5. EXTRACȚIA LICHID-LICHID **33**
5.1. PARAMETRII PROCESULUI DE EXTRACȚIE . 34
5.1.1. Constanta de repartiție 34
5.1.2. Coeficientul de extracție 35
5.1.3. Factorul de recuperare 36
5.2. CLASIFICAREA SISTEMELOR DE EXTRACȚIE 37
5.2.1. Specii simple 37
5.2.2. Complecşi metalici cu reactivi organici 37
5.2.3. Perechi ionice 38
5.2.4. Specii solvatate 38
5.3. SISTEME DE EXTRACȚIE 40
5.3.1. Extracția chelaților metalici 40
5.3.2. Extracția amino-compuşilor 44
5.3.3. Extracția compuşilor organo-fosforici 45
5.3.4. Extracția halogenurilor metalice 46
5.4. PROCEDEE DE EXTRACȚIE 47
5.4.1. Extracția simplă 47
5.4.2. Extracția continuă 49
5.4.3. Extracția în contracurent 49

5.5. Concentrarea prin extracţie 50
5.5.1. Factorii care influenţează concentrarea prin extracţie 51
5.6. EXTRACŢIA SINERGETICĂ 53
5.6.1. Mecanismul extracţiei sinergice 54
6. SEPARAREA ÎN PREZENŢA SCHIMBĂTORILOR DE IONI 56
6.1. PROPRIETĂŢILE FIZICO-CHIMICE ALE SCHIMBĂTORILOR DE IONI 56
6.2. SELECTIVITATEA ŞI ECHILIBRUL DE SCHIMB AL SCHIMBULUI IONIC 58
6.2.1. Selectivitatea 58
6.2.2. Echilibrul de schimb ionic 59
6.2.3. Distribuţia în prezenţa agenţilor de complexare 62
6.2.4. Distribuţia în absenţa schimbului ionic 63
7. SEPARAREA ÎN RAPORT CU DIMENSIUNILE PARTICULELOR 65
8. METODE CROMATOGRAFICE 67
8.1. DEFINIŢIE ŞI CARACTERISTICI 67
8.1.1. Clasificarea metodelor cromatografice 68
8.2. PROCEDEUL ELUŢIEI 69
8.2.1. Dinamica migrării prin procedeul eluţiei 69
8.2.2. Tehnici de eluţie 77
9. CROMATOGRAFIA DE LICHIDE PE COLOANĂ 79
9.1. APARATURĂ 79
9.2. CROMATOGRAFIA DE ADSORBŢIE 82
9.3. CROMATOGRAFIA DE REPARTIŢIE 83
9.4. CROMATOGRAFIA PRIN SCHIMB IONIC 84
9.5. CROMATOGRAFIA PERECHILOR IONICE 85
9.6. CROMATOGRAFIA DE EXCLUDERE-DIFUZIE 87
9.7. CROMATOGRAFIA DE AFINITATE 88

9.8. APLICAȚII ALE CROMATOGRAFIEI DE LICHIDE PE COLOANĂ 88
10. CROMATOGRAFIA DE GAZE 90
10.1. APARATURA 90
10.1.1. Ansamblul de alimentare cu gazul purtător.... 92
10.1.2. Dispozitivul pentru introducerea probei. Coloane de separare 93
10.1.3. Detectoarele 94
10.1.4. Reglarea temperaturii 95
10.2. MATERIALE CROMATOGRAFICE 96
10.2.1. Faze staționare lichide 96
10.2.2. Suportul 97
10.2.3. Faze staționare solide active 97
10.3. ANALIZA CALITATIVĂ 98
10.4. ANALIZA CANTITATIVĂ 99
10.4.1. Determinarea prin intermediul cromatogramei 99
10.4.2. Prelucrarea automata a datelor cromatografice 101
10.5. APLICAȚII 102
11. CROMATOGRAFIA PLANĂ 103
11.1. ASPECTE TEORETICE 103
11.2. MATERIALE CROMATOGRAFICE 105
11.2.1. Faza staționară 105
11.2.2. Faza mobilă 106
11.3. APARATURA 106
11.4. ANALIZA 107
11.5. APLICAȚII 108
12. EXTRACȚIA CROMATOGRAFICĂ 110
12.1. FAZE STAȚIONARE ORGANICE PE SUPORT INERT 111
12.2. FAZE STAȚIONARE APOASE PE SCHIMBĂTORI DE IONI 114

13. METODE DE SEPARARE BAZATE PE VITEZA DE TRANSPORT 117
13.1. STUDIUL TEORETIC AL DEPLASĂRII ELECTROFORETICE. ORIGINEA SARCINILOR .. 118
13.2. FACTORII CARE AFECTEAZĂ MIGRAREA IONILOR 122
13.3. REZOLUȚIA 124
13.4 TEHNICI ELECTROFORETICE 125
13.4.1 Electroforeza pe coloană de lichid (electroforeza de frontieră) 125
13.4.2.Electroforeza pe suport poros (electroforeza de zonă) 127
13.4.3. Electroforeza cu focalizare izoelectrică 129
13.5 ALTE METODE ELECTROFORETICE 130
13.5.1 Electroforeza de afinitate 130
13.4.2 Imunoelectroforeza 131
13.5.3 Electroforeza bidimensională 133
Electroforeza de înaltă performanță. 140
14. FRACȚIONAREA PRIN CURGERE ÎN CÂMP . 144
14.1. PRINCIPIUL METODEI 144
15. TOPIREA ZONALĂ 146
15.1. PRINCIPIUL METODEI 146
15.2. DIAGRAME DE FAZE S-L 148
15.3. DISTRIBUȚIA IMPURITĂȚII 151
15.4. APARATURA 154
15.5. APLICAȚII 154
BIBLIOGRAFIE 157

PREFAȚĂ

În prezent, metodele de separare cu aplicații în analiza chimică se impun în mod deosebit datorită evoluției spectaculoase a cercetărilor științifice și tehnologiilor de fabricație în domeniul numeroaselor ramuri ale chimiei și în toate industriile aferente. Controlul riguros cu exigențe sporite privind gradul de precizie, precum și necesitatea determinării compoziției unor substanțe naturale și industriale de mare complexitate, au condus la instituirea unor metode de analiză cu parametri înalți de sensibilitate și eficacitate.

Metodele de analiză directă prezintă, în general, o sensibilitate limitată, ceea ce a impulsionat orientarea cercetărilor în sensul elaborării unor procedee de separare cât mai eficiente, concomitent cu concentrări ale substanțelor în urme până la nivelul accesibil metodelor moderne de analiză.

Analiza unor probe complexe, așa cum se impune astăzi în mod frecvent chimiei analitice, nu se poate efectua prin determinarea directă a componenților în condiții de coprezență, deoarece nu există practic nici un reactiv al cărui grad de selectivitate să-l facă insensibil la interferențe și nici un aparat de măsură, oricât ar fi de performant, care să nu conducă la rezultate eronate, dacă constituentul analizat se găsește însoțit de alte substanțe care pot afecta valorile găsite.

Analiza corectă a unei probe multicomponente impune ca, înaintea operației de măsurare prin oricare dintre metodele analitice, să se procedeze la separarea constituenților unul de celălalt. În consecință, a fost impulsionată dezvoltarea teoretică și practică a metodelor analitice de separare, ajungându-se actualmente la

selectivităţi şi performanţe cu totul deosebite. Scopul analitic al separării constă în desprinderea componenţilor chimici din proba iniţială, în medii libere de orice interferenţi, asigurându-se astfel condiţii care să permită determinarea lor corectă.

În această lucrare sunt prezentate principalele metode analitice de separare, cu aplicaţii largi în laboratoarele de cercetare şi cele de pe lângă uzine cu profiluri dintre cele mai variate.

Organizarea materialului include la început o parte generală în care, după o succintă introducere privind importanţa relaţiei distribuţiei interfazice şi clasificarea metodelor de separare, se tratează, în comun, principalele mecanisme de separare a căror exploatare a dus la rezultate bune în chimia analitică.

În continuare, în lucrare sunt prezentate metodele de separare bazate pe precipitare, pe volatilizare, pe extracţia în solvenţi nemiscibili, procedee cromatografice şi alte metode ca: fracţionarea prin curgere în câmp, topirea zonală, electroforeza, etc. Un accent deosebit s-a acordat metodelor cromatografice cu variantele lor datorită superiorităţii lor şi ariei largi de utilizare.

În cadrul fiecărui procedeu de separare se prezintă aspectele teoretice care le particularizează, limitate numai la acelea care sunt necesare înţelegerii principiilor metodologice şi impuse de implicaţiile lor practice. De asemenea, sunt descrise fără a intra în detalii tehnice, componentele principale ale aparaturii, materialele corespunzătoare, modul de lucru, obţinerea şi interpretarea rezultatelor. În încheierea fiecărui procedeu de separare sunt incluse aplicaţii practice semnificative selecţionate astfel încât să-i reprezinte posibilităţile şi performanţele.

Lucrarea se adresează deopotrivă tuturor celor care îşi desfăşoară activitatea profesională în laboratoarele de cercetare ştiinţifică, în domeniul numeroaselor ramuri ale chimiei (chimie anorganică, chimie organică, chimie-fizică, biochimie, medicină, farmacie, agronomie sau chimie alimentară) şi în toate industriile aferente.

Lucrarea poate fi folosită de studenţii anului II de la Facultatea de Chimie (toate specializările), precum şi de studenţii de la facultăţile profilate pe specialităţile menţionate.

Autorii

1. METODELE DE SEPARARE-PARTE INTEGRANTĂ A CHIMIEI ANALITICE

1.1 NECESITATEA PROCESELOR DE SEPARARE

Chimia analitică a avut de rezolvat problema elaborării unor metode şi aparate de analiză chimică calitativ superioare ca ***eficacitate, sensibilitate*** şi ***economicitate*** faţă de metodele clasice.

Aparatura analitică modernă trebuie să îmbine, în mod armonios, următoarele caracteristici: ***exactitate***, ***selectivitate***, ***sensibilitate***, ***rapiditate*** şi ***accesibilitate***.

Experienţa a demonstrat că realizarea tuturor acestor condiţii tehnice nu este posibilă fără separarea judicioasă a tuturor constituenţilor probei, înainte de a se proceda la determinarea lor cantitativă. Analiza unei probe complexe, în condiţii de coprezenţă, aşa cum se impune astăzi în mod frecvent chimiei analitice, nu se poate efectua prin determinarea directă a componenţilor, deoarece nu există practic nici un reactiv al cărui grad de selectivitate să-l facă insensibil la interferenţe şi nici un aparat de măsură, oricât ar fi de perfecţionat, care să nu conducă la rezultate eronate, dacă constituentul analizat se găseşte alături de alte substanţe care pot afecta valorile găsite. În cazul unor amestecuri de complexitate moderată, se pot face determinări în prezenţă, dacă elementele interferente sunt transferate în forme care să nu denatureze rezultatele în sistemul selecţionat pentru evaluarea constituentului de analizat.

În acest scop, se introduc în mod auxiliar agenţi selectivi de complexare pentru mascare sau reactivi care să modifice starea de oxidare a ionilor jenanţi. Aceste intervenţii sunt însă foarte limitate.

Analiza corectă a unei probe multicomponente impune ca, înaintea operației de măsurare, prin oricare din metodele analitice să se procedeze la separarea constituenților unul de celălalt. În consecință, a fost impulsionată dezvoltarea atât teoretică cât și practică a metodelor analitice de separare. Din punct de vedere analitic ***separarea se definește printr-un proces ipotetic de izolare a „n" fracțiuni distincte macroscopice, fiecare fracțiune cuprinzând unul din cei n componenți care constituie amestecul de analizat.***

Prin urmare, scopul analitic al separării constă în desprinderea componenților chimici din proba inițială, în medii libere de orice interferență, asigurându-se astfel condiții care să permită determinarea lor corectă. Prin termenul „ipotetic" se precizează imposibilitatea practică de a realiza o separare absolută a componenților din mixtură, datorită intervenției unor cauze multiple care declanșează întrepătrunderi și interferențe.

Analiza cantitativă obișnuită se realizează în următoarele etape:

- ***selecționarea și prepararea probei;***
- ***măsurarea probei;***
- ***aducerea probei în condițiile impuse de procedeul analitic ales pentru separarea și determinarea componenților;***
- ***dizolvarea probei;***
- ***separarea componenților,***
- ***determinarea analitică;***
- ***prelucrarea și interpretarea rezultatelor.***

În toate procedeele analitice se impune o discriminare netă între etapa separării și cea a determinării. Există unele tehnici analitice cum sunt cromatografia de gaze și cea de lichide la presiune înaltă, care sunt prevăzute cu dispozitive pentru îndeplinirea ambelor funcțiuni asociind separarea cu determinarea. Totuși și în aceste procedee cele două etape

nu se pot confunda, etapa determinării reflectând eficiența separării. În general, se poate afirma că nici o metodă nu conduce la o evaluare corectă a componenților, fără să fie precedată de o separare.

1.2 ROLUL FAZELOR

Toate metodele de separare se bazează pe separarea componenților în faze diferite. Prin ***fază*** se înțelege o parte omogenă dintr-un sistem, separată de celelalte părți ale sistemului prin suprafețe distincte, în dreptul cărora are loc o variație bruscă a proprietăților fizice. Pentru a separa o specie de alta prin izolare în faze diferite trebuie ca procesul să fie selectiv. Astfel, o separare ideală a doi componenți A și B, coprezenți într-o fază omogenă, constă în izolarea lui A într-o fază care exclude pe B și transferarea lui B în a doua fază, care respinge pe A.

Orice schemă generală a unui proces de separare cuprinde trei etape importante:

În ***prima etapă*** se pornește de la o fază omogenă la care se ajunge printr-un procedeu fizic (de ex.: aducerea în soluție).

În ***etapa a doua*** apare o nouă fază, realizându-se un sistem eterogen ca urmare a unor transformări chimice sau a unor procedee fizice (de ex.: adăugarea unui solvent nemiscibil cu apa, care extrage un constituent, ridicarea temperaturii până la volatilizarea unuia din componenți).

În ***cea de-a treia etapă*** se despart fazele prin operații mecanice, fizice și mai rar chimice.

Uneori ultimele două etape se realizează simultan (de ex.: separarea electrolitică a unui metal sau izolarea unui precipitat prin fierbere).

Orice separare analitică presupune stabilirea unor echilibre interfazice, ale căror modificări dirijate sunt

consecinţe ale variaţiei condiţiilor exterioare sistemului. Cele mai multe probleme care stau în faţa unui chimist analist sunt legate de controlul şi stabilirea celor mai indicate stări de echilibru, corespunzătoare sistemelor studiate. Se pot aborda diverse tipuri de echilibre. De ex.: se pot stimula condiţii pentru solubilizări; pentru precipitări sau cristalizări, pentru extracţii în solvenţi nemiscibili, etc. Descrierea acestor echilibre se realizează prin relaţii cantitative, furnizate mulţumitor de legea fazelor, care poate sugera selectarea condiţiilor pentru realizarea determinării. Din punct de vedere analitic, într-o metodă de separare interesează doar unele variabile intensive ca temperatura, presiunea şi compoziţia respectiv, concentraţia fiecărei specii. Specificând două din cele trei variabile, a treia este în mod automat determinată.

Legea fazelor indică numărul gradelor de libertate (L) în funcţie de numărul minim de componenţi (C) necesar pentru definirea compoziţiei sistemului şi de numărul de faze (F):

$$L = C - F + 2$$

Această lege precizează numărul maxim de variabile, care se pot alege în mod arbitrar, pentru a defini o anumită poziţie în sistem.

1.3 ECHILIBRUL INTERFAZIC

Echilibrul se defineşte, în general, prin condiţia invariabilităţii proprietăţilor macroscopice ale sistemului în timp. În cadrul oricăror separări, se consideră stabil echilibrul când nu mai are loc fenomenul de transfer interfazic, ceea ce reprezintă sub aspect macroscopic un repaus aparent absolut. De fapt, în acest moment transferurile interfazice au loc cu viteze egale, în ambele sensuri, echilibrul fiind un proces dinamic. Din punct de

vedere termodinamic, echilibrul este atins când nu se mai constată nici o variaţie a energiei libere în sistem, la T şi p constantă $(\Delta G)_{T,p}=0$.

În ambele faze aflate în echilibru, potenţialele chimice ale speciei i (μ_i) sunt egale:

$$\mu_i^1 = \mu_i^2 \tag{1}$$

În funcţie de metoda de separare, fazele puse în contact notate prin 1 şi 2 au denumiri specifice ca: fază staţionară şi fază mobilă în cromatografie, rafinat şi extractant în extracţia lichid-lichid, etc.

Deoarece valorile absolute ale energiilor libere şi ale potenţialelor chimice nu pot fi măsurate, s-au definit în mod arbitrar stări standard (μ^0). Potenţialul chimic al unei substanţe „i" are expresia:

$$\mu_i = \mu_i^0 + R \cdot T \cdot ln \frac{p_i}{p_i^0} \tag{2}$$

unde: p_i şi p_i^0 sunt presiuni de vapori.

Deoarece p_i^0 este o presiune de vapori standard egală cu 1 atm atunci, ecuaţia (2) se reduce la:

$$\mu_i = \mu_i^0 + R \cdot T \cdot ln\, p_i \tag{3}$$

Variaţia presiunii p în funcţie de temperatura absolută T pentru orice modificare de stare (de ex.: topire, evaporare, etc.) este dată, după cum se ştie, de ecuaţia Clapeyron:

$$\frac{dp}{dt} = \frac{\Delta H}{T\Delta V} \tag{4}$$

Mărimea ΔV reprezintă diferența între volumele molare aparținând celor două stări, iar ΔH este variația entalpiei asociată schimbării de stare.

În cazul particular al evaporărilor (modificare de stare lichid-vapori) se poate înlocui ΔV, cu volumul molar parțial al vaporilor, deoarece volumul lichidului, prin comparație este mic. Substituind volumul cu RT/p, conform legii gazelor ideale, ecuația (4) devine:

$$\frac{d(\ln p)}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2} \tag{5}$$

cunoscută sub numele de ecuația Clausius-Clapeyron, aplicabilă sistemelor lichid-vapori. Dacă se presupune ΔH = ct., ecuația (5) după integrare devine:

$$lg \frac{p_a^0}{p_b^0} = -\frac{\Delta H}{2{,}3} \cdot \left(\frac{1}{T_a} - \frac{1}{T_b} \right) \tag{6}$$

unde p_a^0 și p_b^0 reprezintă presiunile de vapori pentru un anumit component la două temperaturi T_a și T_b.

Ecuația (6) este importantă în separările prin distilare și în cromatografia lichid-gaz. Presupunând că două substanțe A și B au aceeași valoare ΔH, ecuația (6) devine:

$$lg \frac{p_A^0}{p_B^0} = -\frac{\Delta H}{2{,}3} \cdot \left(\frac{1}{T_A} - \frac{1}{T_B} \right) \tag{7}$$

unde p_A^0 și p_B^0 sunt presiunile de vapori ale componentelor A și B ale căror temperaturi de fierbere sunt T_A și T_B.

Prin combinarea ***regulii lui Tronton*** ($\Delta H=21\cdot T_f$), unde T_f este temperatura de fierbere cu ***ecuația Clausius-Clapeyron***, rezultă:

$$lg\frac{p_A^0}{p_B^0}=8{,}9\cdot\frac{T_B-T_A}{T_A+T_B} \tag{8}$$

unde $T_B>T_A$, componentul A fiind mai volatil decât B. Deoarece, coeficientul de selectivitate, α, este egal cu raportul p_A^0 / p_B^0, ecuația (8) devine:

$$lg\,\alpha=8{,}9\cdot\frac{T_B-T_A}{T_A+T_B} \tag{9}$$

o expresie deosebit de utilă în aprecierea unei separări.

În cele mai multe metode de separare, echilibrul interfazic se exprimă prin ***coeficientul de distribuție***, definit, printr-un raport de concentrații. Astfel, pentru solutul A:

$$D_A=\frac{C_A^1}{C_A^2} \tag{10}$$

sau concentrația componentului A în faza 1 raportată la concentrația componentului B în faza 2, înțelegând prin C o concentrație analitică.

Prin urmare, valoarea lui D se poate modifica cu concentrația, când se schimbă cantitățile relative de component. Se obișnuiește formularea lui D prin raportul concentrațiilor molare în ambele faze, când se presupune distribuția solutului într-o singură formă:

$$D_A = \frac{[A]_1}{[A]_2} \tag{11}$$

sau:

$$D_A = \frac{(m_A)_1}{(m_A)_2} \cdot \frac{V_2}{V_1} \tag{12}$$

unde V_1 şi V_2 sunt volume de fază.

Raportul maselor aceluiaşi solut în cele două faze se numeşte ***raport de distribuţie*** sau ***factor de capacitate, K'***:

$$K' = D \cdot \frac{V_1}{V_2} = D \cdot \beta \tag{13}$$

Factorul de capacitate are importanţă în toate metodele de separare, cu precădere în cromatografie, fiind unul din principalii parametri care măsoară eficienţa şi permite optimizarea separării.

1.4 CLASIFICAREA METODELOR DE SEPARARE

În general, sistemele complexe de analiză implică 3 etape:

- prelevarea şi pregătirea probei;
- separarea;
- măsurarea

Dintre cele trei etape separarea are cele mai mari implicaţii în analiza unui material. Datorită unei mari varietăţii ale metodelor de separare, aproape nu există schemă de clasificare generală, care să nu fie susceptibilă de

interpretări critice. Având în vedere procesele de bază, metodele de separare au fost grupate în trei categorii:

A. Metode de separare bazate pe echilibru între faze

În aceste metode este valorificată diferența între proprietățile de repartiție ale componenților amestecului între două faze în contact și nemiscibile.

G - L	G – S	L - L	L - S
distilarea	adsorbția	extracția	cromatografia L-S
cromatografia G-L	cromatografia G-S	cromatografia L-L	cromatografia prin excluziune sterică
fracționarea spumelor	sublimarea	excluziunea	cromatografia de afinitate
		flotația ionică	precipitarea
		fracționarea prin curgere în câmp	topirea zonală
			cristalizarea fracționată
			schimbul ionic
			adsorbția
			compuși de incluziune
			extracția capilară termică pe suport

B. Metode de separare bazate pe viteza de transport

În această variantă sunt implicate proprietățile cinetice ale componenților din amestec.

1. Separare bazată pe bariere:

- Filtrarea prin membrane;

- ❖ Dializa;
- ❖ Electrodializa;
- ❖ Electroosmoza;
- ❖ Osmoza inversă;
- ❖ Difuzia gazoasă.

2. Separare bazată pe câmpuri:

- ❖ Electroforeza;
- ❖ Ultracentrifugarea;
- ❖ Difuzia termică;
- ❖ Spectrometria de masă.

3. Alte metode de separare:

- ❖ Distilarea moleculară;
- ❖ Degradarea enzimatică;
- ❖ Distilarea destructivă.

C. Metode de separare bazate pe natura procesului

1. Proces mecanic:

- ❖ Dializa;
- ❖ Cromatografia prin excluziune sterică;
- ❖ Formarea compusului de incluziune;
- ❖ Filtrarea şi ultrafiltrarea;
- ❖ Centrifugarea.

2. Proces fizic:

- ❖ Extracţia;
- ❖ Cromatografia G-L;
- ❖ Cromatografia G-S;
- ❖ Cromatografia L-L;
- ❖ Cromatografia L-S,
- ❖ Flotaţia;
- ❖ Electroforeza;
- ❖ Extracţia capilară termică pe suport;
- ❖ Adsorbţia;
- ❖ Coprecipitarea;
- ❖ Topirea zonală;
- ❖ Distilarea;

- ❖ Sublimarea;
- ❖ Cristalizarea.

3. Proces chimic:

- ❖ Schimbul ionic;
- ❖ Cromatografia de afinitate;
- ❖ Precipitarea;
- ❖ Electrodepunerea;
- ❖ Degradarea enzimatică;
- ❖ Distilarea destructivă.

Metodele de separare uzuale pe care le vom studia noi în acest material le-am grupat în cinci categorii:

1. ***Metode de separare prin precipitare;***
2. ***Metode de separare prin volatilizare;***
3. ***Extracția lichid-lichid;***
4. ***Metode cromatografice;***
5. ***Alte metode: fracționarea prin curgere în timp, topirea zonală și separarea în prezența schimbătorilor de ioni.***

1.5 MĂSURA EFICIENȚEI UNEI SEPARĂRI

În practica separărilor din analiza chimică se urmăresc două obiective fundamentale:

- Recuperarea cantitativă a tuturor componenților din probă;
- Gradul superior de izolare a componenților în medii libere de interferențe care să permită determinările lor corecte.

Măsura îndeplinirii acestor obiective se apreciază prin intermediul următoarelor mărimi:

- o ***Factor de recuperare;***
- o ***Factor de separare;***
- o ***Factor de selectivitate;***
- o ***Grad de separare;***

- *Înălțimea talerului teoretic;*
- *Factor de întârziere cromatografic.*

Factorul de recuperare, R, al unui component A, se exprimă prin raportul dintre cantitatea izolată (Q_A) și cantitatea inițială din probă $(Q_A)_i$:

$$R = \frac{Q_A}{(Q_A)_i} \tag{14}$$

Valoarea acestui factor depinde de cantitatea relativă a componentului din probă. Când acesta se află în cantitate mare, $R \cong 0{,}999$, iar când se află la nivel de urme (10^{-4} - 10^{-3} %), se poate accepta $R \geq 0{,}95$.

Factorul de separare, S, se definește de obicei în funcție de componentul care interferă. De ex, pentru componentul B, $S_{B/A}$ are valoarea care multiplicată cu raportul cantităților inițiale $\left(\frac{Q_B}{Q_A}\right)_i$ dă raportul cantităților izolate $\left(\frac{Q_B}{Q_A}\right)$:

$$\frac{Q_B}{Q_A} = S_{B/A} \cdot \frac{(Q_B)_i}{(Q_A)_i} \tag{15}$$

sau:

$$S_{B/A} = \frac{(Q_A)_i}{(Q_B)_i} \cdot \frac{Q_B}{Q_A} = \frac{R_A}{R_B} \tag{16}$$

Deoarece într-o metodă cantitativă $R_A \cong 1$, rezultă că:

$$S_{B/A} = \frac{Q_B}{(Q_B)_i} \qquad (17)$$

Dacă se consideră extracția speciei A cantitativă, atunci Q_A=1 iar factorul de separare $S_{B/A}$ reprezintă fracțiunea extrasă din specia B.

Din măsurătorile efectuate s-a dedus că pentru constituenții care se află într-o proporție >10% în probă, factorul de separare al componentului nedorit este de cel puțin 0,001.

Factorul de selectivitate. La evaluarea eficienței unei separări adeseori se apreciază separarea numai a doi constituenți din probă desemnați ca standarde sau selecționați ca pereche de specii care ridică cele mai mari probleme de separare.

Pentru un asemenea sistem binar s-a introdus factorul de selectivitate, α, numit uneori și ***coeficient de separare***. În metodele de separare bazate pe echilibre interfazice, α, se exprimă prin raportul coeficienților de distribuție ai celor doi componenți:

$$\alpha = \frac{D_B}{D_A} \qquad (18)$$

Factorul de selectivitate trebuie să posede valori egale sau mai mari decât unitatea. Cu cât aceste valori sunt mai mari cu atât separarea se consideră mai eficientă.

Gradul de separare este analog factorului de recuperare, tinzând către unitate în cazul unei separări bune și către zero în cazul unei separări nereușite.

Înălțimea talerului teoretic, "H", reprezintă o mărime fundamentală în metodele de separare bazate pe echilibre interfazice (de ex. în cromatografie sau în extracție).

O coloană de separare eficientă trebuie să cuprindă un număr mare de talere, ceea ce implică o înălțime foarte redusă a fiecărui taler. Este definit ca:

$$H = \frac{L}{N} \tag{19}$$

unde: L- lungimea coloanei (cm); N- numărul de talere (adimensional).

Factorul de întârziere cromatografic, R. În cromatografie, estimarea procesului de separare se bazează pe diferențele între mobilitățile componenților din amestecul de analizat.

Componenții vor migra de-a lungul coloanei, în ordinea descrescătoare a afinităților lor pentru faza staționară și în funcție de viteza fazei mobile.

Fiecărui component îi corespunde o anumită valoare R dată de raportul dintre media vitezei de migrare a zonei ($\overline{v_z}$) și media vitezei de deplasare a fazei mobile ($\overline{v}$) prin coloana cromatografică:

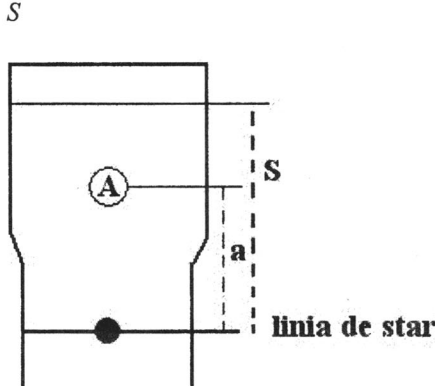
$$R = \frac{\overline{v_z}}{\overline{v}} \tag{20}$$

În cromatografie, deplasarea componenților prin coloană este diferită, în funcție de coeficienții lor de distribuție. Astfel, două substanțe A și B caracterizate prin coeficienții lor de distribuție D_A și D_B se vor deplasa prin coloana cromatografică cu viteze diferite, potrivit valorilor proprii corespunzătoare R_A și R_B.

Dacă se presupune că $D_A > D_B$, atunci R_A va fi mai mic decât R_B și prin urmare componentul B va migra prin coloană mai repede decât A.

În cromatografia plană (pe hârtie sau în strat subțire) valoarea lui R se notează cu R_F și ia valori între 0 și 1. În acest caz se numește ***coeficient de retenție*** și reprezintă raportul dintre distanța la care a migrat componentul (a) și distanța la care se află frontul solventului (S).

$$R_F = \frac{a}{S} \tag{21}$$



R_F este o constantă în condiții experimentale precizate.

Când procesul cromatografic necesită un timp mai lung, componenții separați părăsesc coloana și se caracterizează printr-un ***volum de retenție***, V_R, care reprezintă volumul fazei mobile colectat la baza coloanei, între momentul introducerii solutului la partea superioară a coloanei și cel corespunzător apariției concentrației sale maxime la partea inferioară a acesteia.

Dacă înregistrarea variației concentrației s-a efectuat în funcție de timp, în locul volumului se obține în mod similar, ***timpul de retenție, t_R.***

Dacă viteza medie a solutului este: $\overline{v_z} = \frac{L}{t_r}$ și viteza medie a solventului este $\bar{v} = \frac{L}{t_M}$, unde t_M este timpul de retenție al unui component total nereținut pe faza staționară, rezultă:

$$R = \frac{\overline{v_z}}{\bar{v}} = \frac{(L/t_R)}{(L/t_M)} = \frac{t_M}{t_R} \qquad (22)$$

Presupunând debitul (D) al fazei mobile constant, relația (22) poate fi convertită în volume echivalente:

$$R = \frac{V_M}{V_R} = \frac{V_M}{V_M + D \cdot V_S} \qquad (23)$$

rezultând o relație foarte importantă în cromatografie:

$$V_R = V_M + D \cdot V_S \qquad (24)$$

2. MECANISME DE SEPARARE

Orice separare bazată pe distribuţie interfazică se explică prin deosebirile de comportament ale componenţilor amestecului de analizat, în raport cu cele două faze cu care vin în contact, ceea ce se concretizează în particular prin echilibre reversibile sau ireversibile.

Reproducerea unui procedeu de separare şi adaptarea lui la condiţiile proprii de lucru impune cunoaşterea mecanismului de separare şi implicit a parametrilor care intervin şi asupra cărora se poate acţiona.

Pentru o separare bună a componenţilor dintr-un amestec de analizat este necesar să se respecte următoarele recomandări:

1. forma fizico-chimică cea mai convenabilă, sub care diverşi componenţi pot fi supuşi procesului de separare;
2. alegerea judicioasă a naturii, structurii şi compoziţiei cuplului de faze care constituie sistemul de separare;
3. liniaritatea izotermelor de distribuţie a componenţilor, ceea ce presupune valori constante ale coeficienţilor de distribuţie;
4. cantitatea de probă luată în lucru să fie convenabilă pentru detecţia şi determinarea tuturor componenţilor, inclusiv a celor existenţi în urme;
5. cunoaşterea factorilor favorabili şi nefavorabili, care intervin în procesul de separare;
6. asigurarea reproductibilităţi rezultatelor.

În general, separarea componenţilor dintr-un amestec este condiţionată de deosebirile între aptitudinilor moleculelor de a se distribui între fazele ce constituie sistemul de separare.

Principalele caracteristici care definesc o anumită moleculă sau un anumit ion, în mod individual sau în prezența unor alte molecule sau ioni sunt:

- potențialul de ionizare;
- afinitatea pentru electroni;
- volumul molar;
- raza ionică;
- potențialul ionic;
- numărul de coordinație;
- dipol-momentul;
- constanta dielectică;
- temperatura de fierbere și presiunea de vapori;
- solubilitatea;
- coeficienții de activitate;
- parametrul de solubilitate Hildebrand;
- parametrul de adsorbție Snyder.

Toate aceste caracteristici guvernează procesul de distribuție. În general, o moleculă a unui solut este supusă unor interacții provenite din trei direcții: interacții cu moleculele fiecăreia din cele două faze cu care vine în contact și interacții cu moleculele vecine.

Natura forțelor care reține moleculele de solut în faze determină tipul de sorbție. Acesta poate fi la suprafața unei faze (adsorbție) sau în interiorul său (absorbție).

În chimia analitică a metodelor de separare s-a adoptat, în mod convențional, denumirea de repartiție pentru fenomenul de absorbție.

3. SEPARAEA PRIN PRECIPITARE

Se bazează pe transferul speciei dintr-o fază lichidă, într-o fază solidă, urmat de izolarea acesteia din soluție printr-un proces mecanic (filtrare, centrifugare, etc.). Se pot utiliza diferiți agenți precipitanți anorganici sau organici care să prezinte selectivități variabile, în funcție de natura lor, de pH și de capacitatea de a forma combinații complexe stabile.

Pentru realizarea unei separări cantitative prin precipitare se recomandă ca valoarea produsului de solubilitate, P_S, să fie mai mică de 10^{-4}. Excesul de precipitant favorizează precipitarea completă prin ***influența ionului comun***.

Formarea precipitatelor în vederea executării unei separări cantitative impune aplicarea unei metodologii riguroase care să conducă la produși de înaltă puritate, cristalini și ușor filtrabili. Pentru aceasta este necesar să se urmărească riguros cele două principale etape: ***nucleerea*** și ***creșterea cristalelor***. Etapa nucleerii este o consecință a suprasaturării soluției. Se definește prin suprasaturarea relativă (s.r.) raportul:

$$s.r. = \frac{Q - S}{S}$$

unde: Q= cantitatea totală a substanței care precipită;

S= solubilitatea la echilibru a cristalelor mari

Procesul de nucleere guvernează puritatea precipitatelor. După formarea nucleului cristalin, urmează creșterea lui ordonată până la eliminarea suprasaturării, adică până la atingerea echilibrului de precipitare. În general, cristalele mari cresc pe seama cristalelor mai mici.

Un alt mecanism utilizat la separarea prin precipitare, se bazează pe controlul cinetic al cristalizării, realizat prin eliberarea treptată a agentului de precipitare direct în mediul de reacţie.

Acest mod de precipitare lentă, în mediu omogen are drept consecinţă formarea unui număr mic de nuclee şi a unei suprasaturări reduse, ceea ce conduce la formarea unor cristale mari, cu o formă geometrică regulată, o suprafaţă de adsorbţie neglijabilă şi uşor filtrabile.

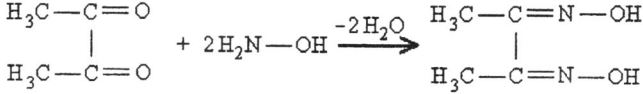
Cele mai multe procedee de precipitare în mediu omogen se bazează pe modificarea lentă a pH-ului (mediului de precipitare). Reactivii frecvent folosiţi în acest scop sunt: acetamida, oxicianatul, hexametilentetramina şi în mod special ureea care reacţionează conform reacţiei:

$$(NH_2)_2C{=}O + H_2O \rightleftarrows CO_2 + 2NH_3$$

O serie de esteri sau alte substanţe eliberează reactivii de precipitare printr-o reacţie de hidroliză:

$$(C_2H_5)_2SO_4 + 2H_2O \rightleftarrows 2C_2H_5OH + 2H^+ + SO_4^{2-}$$

O altă serie de aplicaţii ale precipitării lente are la bază chiar sinteza reactivului în mediul de precipitare. Astfel, de exemplu: pentru precipitarea Ni^{2+} se utilizează cuplul de reactivi: diacetilul şi hidroxilamina care reacţionează formând dimetilglioxină:



În contrast cu metoda lentă a precipitării în mediu omogen, s-au elaborat metode de precipitare rapidă, în scopul obținerii într-un timp scurt, a unor informații orientative asupra unui proces în desfășurare, cum sunt cele corespunzătoare controlului în producție.

În acest scop se lucrează în medii fierbinți sub agitare puternică și se măsoară volumul sau înălțimea coloanei de precipitat obținut după centrifugare, în eprubete special gradate.

Se știe că solubilitatea celor mai multe substanțe este puternic influențată de aciditatea soluției. Sub aspectul dependenței de pH, se deosebesc două tipuri de reacții de precipitare:

- ***Reacția de precipitare are loc fără variația pH-ului***:

$$AgNO_3 + HCl \rightarrow AgCl + HNO_3$$

- ***Reacția de precipitare este însoțită de o mărire a acidității soluției, de exemplu***:

$$ZnCl_2 + H_2S \rightarrow ZnS + 2HCl$$

În primul caz, după cum se vede, ionii cu care se face precipitarea sunt anionii corespunzători unor acizi tari a căror concentrație ionică nu este influențată de pH, ei fiind total disociați.

În cel de-al doilea caz, anionii precipitanți provin de la acizi slabi, având concentrațiile ionice dependente de valoarea pH-ului. Tendința lor de a disocia este sensibil micșorată de creșterea $[H^+]$.

Precizăm că influența pH-ului este mare numai în cazul precipitatelor cu solubilitate medie sau mică. În aceste cazuri se impune operarea într-un anumit interval de pH (se folosesc amestecuri tampon).

Acțiunea tampon constă în formarea unui acid slab disociat la mărirea acidității și în formarea apei la mărirea bazicității.

Precipitanții anorganici, în general, nu oferă o selectivitate bună. În schimb cei organici sunt preferați datorită selectivității și a altor avantaje pe care le prezintă (precipitatele formate sunt greu solubile).

Se folosesc cu rezultate bune la separarea prin precipitare, două categorii de precipitanți organici: agenți de chelatizare și formatori de perechi ionice.

Formarea chelatului metalic presupune încorporarea ionului metalic în matricea organică. Dacă compusul este electric neutru și este lipsit de grupări solubilizate, va prezenta o solubilitate foarte redusă în apă.

În general, s-a constatat că un compus are o solubilitate cu atât mai mică cu cât crește volumul și masa moleculară a grupărilor hidrofobizante. Astfel, la înlocuirea grupării metil sau fenil cu gruparea etil și respectiv naftil, lungimea lanțului hidrocarbonat crește și drept urmare solubilitatea intrinsecă a precipitatului metal–chelat scade. De exemplu: sensibilitatea la precipitarea Cu(II) în soluție de HCl 0,2 m crește odată cu folosirea reactivilor: ***acid tioglicolic, anilidă*** și ***α– naftilamidă***.

Altă clasă de reactivi organici este constituită din compuși ionizați în soluție apoasă, care formează cationi sau anioni caracterizați printr-un volum mare. Aceștia se pot combina cu ionii cu sarcină opusă tot cu volum mare, formând săruri greu solubile.

Cei mai mulţi dintre aceşti reactivi sunt de tip R^+ sau RH^+. De exemplu, clorura de trifenilarsoniu în apă ionizează şi reacţionează în special cu anumiţi anioni voluminoşi oxi- sau complex-halogeno-metalici, pentru a forma precipitate greu solubile, cum sunt de exemplu:

$$(C_6H_5)_3As^+ + MnO_4^- \rightleftarrows (C_6H_5)_3AsMnO_4$$

$$2(C_6H_5)_3As^+ + HgCl_4^{2-} \rightleftarrows [(C_6H_5)_3As]_2HgCl_4$$

sau un exemplu de anioni:
ionul tetrafenilborat precipită K^+ şi alţi cationi:

$$[B(C_6H_5)_4]^- + K^+ \rightleftarrows K[B(C_6H_5)_4]$$

3.1 SEPARAREA CONSTITUENŢILOR ÎN URME PRIN PRECIPITARE

Precipitarea completă a unui constituent în urme se realizează prin adăugarea unei cantităţi dintr-o altă substanţă, care precipitând funcţionează ca un colector (purtător) al urmelor primului constituent. Mecanismul de bază este de adsorbţie.

Metoda se aplică la precipitarea hidroxizilor sau a sulfurilor. De exemplu, când se utilizează sulfura de cupru pentru colectarea sulfurii de mercur se pot recupera 0,02 μg de mercur dintr-un litru de soluţie, iar PbS antrenează 1 μg Au, din 1000 L apă de mare.

Colectorii sunt eficienţi când încorporează microcantităţi de component, prin formarea de cristale mixte sau soluţii solide.

Conform regulii empirice enunțate de V. Goldschmidt, un component este înlocuit cu un altul în rețeaua sa dacă razele ionice nu diferă prin mai mult de ± 15 %. Un astfel de exemplu îl constituie izolarea plumbului prin coprecipitarea sa cu sulfat de stronțiu deoarece Pb şi Sr au razele similare (1,32 Å şi 1,27 Å).

La izolarea unor microcantități de metale din apa de mare, se aplică frecvent procedeul coprecipitării cu agenți de precipitare organici. De exemplu, dacă se adaugă o soluție de α–benzoinoximă în acetonă la o soluție de Mo(VI) şi se încălzeşte pentru evaporarea acetonei, benzoinoxima cristalizează, antrenând molibdenul.

Un asemenea tip de colector nu este deosebit de selectiv, dar serveşte la concentrarea unor urme de metal din volume foarte mari de soluție.

De asemenea, microcantități de Ag, Au, Hg, Pd şi Pt pot fi recuperate prin tratarea soluțiilor cu clorură stanoasă şi telur (IV). Precipitatul de telur va fi purtătorul acestor elemente, probabil sub forma unor săruri de telur.

Electrodepunerea

Constă din separarea unor elemente din soluție, prin depunerea lor pe suprafața unor electrozi, sub acțiunea curentului electric.

Printr-un control riguros al parametrilor (U, I, t) şi printr-o alegere judicioasă a electrolitului inert se pot separa ionii metalici dintr-o soluție prin depunerea lor pe electrozi, fie sub formă metalică pe catod, fie ca oxizi pe anod.

La introducerea în soluția de electrolit a doi electrozi confecționați din metal nobil (de obicei Pt) sau din cărbune, dintre care unul încărcat pozitiv iar celălalt negativ, sub acțiunea unei surse de curent continuu, ionii sunt dirijați în

mod ordonat către electrozi în funcţie de tipul lor de sarcină: cationii spre catod, iar anionii spre anod.

La electrozi au loc reacţii între ioni şi electrod prin transfer de electroni (cedare sau acceptare). Operând cu un potenţial catodic constant se poate realiza o depunere secvenţială a diferitelor metale în mod similar cu precipitarea diferenţiată.

Modul de desfăşurare a întregului proces de electroliză se poate anticipa cu ajutorul curbelor de polarizare (curbe I-E). Dacă în soluţie se găsesc mai mulţi ioni metalici ordinea de depunere depinde de potenţialele lor de electrod, astfel încât, prin stabilirea succesiunii se apreciază eficienţa separării prin acest procedeu.

Separarea pe cale electrolitică a doi ioni metalici este posibilă numai dacă potenţialele lor normale diferă cu cel puţin 0,2 V. După valoarea potenţialelor normale, metalele care se determină frecvent pe cale electrolitică au fost împărţite în 4 grupe:

1. grupa metalelor nobile: Au, Pt, Hg, Ag;
2. grupa cuprului: Cu, Bi, Sb, As;
3. grupa plumbului: Pb, Sn.;
4. grupa zincului: Zn, Ni, Co, Cd.

Pentru o separare ideală metalele din amestec trebuie să aparţină la grupe diferite. În caz contrar se impune asocierea potenţialului constant cu variaţia pH-ului sau cu formarea de complecşi, parametri care modifică valoarea potenţialelor normale.

Pentru separări de urme se foloseşte electroliza internă. Aceasta se utilizează în special la determinarea microcantităţilor de Sb, Co şi Bi.

4. SEPARAREA PRIN VOLATILIZARE

Separarea prin volatilizare se bazează pe diferenţele dintre presiunile de vapori ale lichidelor ce compun amestecul. Substanţele ale căror presiuni de vapori sunt mai mari, fierb la temperaturi mai joase putând fi separate de celelalte prin distilare.

Distilarea este cea mai veche tehnică de separare aplicată la separarea compuşilor chimici de natură organică. În prezent, această tehnică a înregistrat un uşor declin, odată cu dezvoltarea cromatografiei de gaze, distilarea aplicându-se actualmente în laboratoarele analitice numai ca metodă de separare preliminară, urmând ca analiza fracţiunilor obţinute să se efectueze prin tehnici de separare cu putere mare de rezoluţie.

Distilarea, ca procedeu analitic, are la bază distribuţia componenţilor conform volatilităţii lor între faza de vapori şi faza lichidă, ambele aflate în echilibru.

Coeficientul de distribuţie al substanţei A, D_A între faza de vapori şi faza lichidă pentru o anumită temperatură şi presiune este definit prin:

$$D_A = \frac{[A]_v}{[A]_l}$$

unde: $[A]_v$ şi $[A]_l$ reprezintă concentraţiile speciei A în faza de vapori şi respectiv în faza lichidă.

Valoarea acestui coeficient de distribuţie se află prin determinarea concentraţiei componentului în faza lichidă şi în faza de vapori, după ce aceasta a fost condensată.

Reprezentarea grafică a proporţiilor de componenţi în distilat, în funcţie de variaţia temperaturilor de fierbere, constituie **curba de distilare** sau **curba de colectare:**

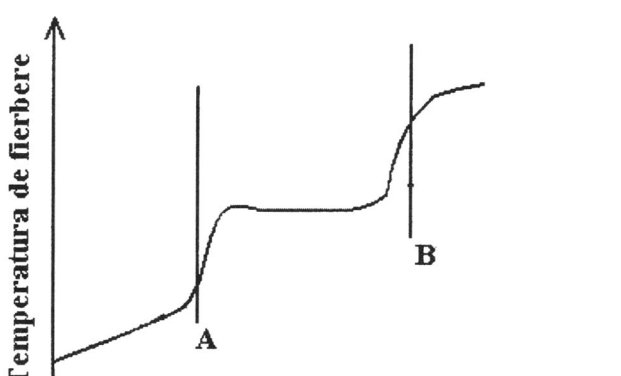


Figura 1. Curba de distilare sau curba de colectare

Treptele A şi B din figură corespund componenţilor care pot fi determinaţi prin măsurarea masei şi volumului de distilat corespunzător. În general curba nu înregistrează etape nete ci o creştere progresivă, ceea ce impune analizarea continuă a unor fracţiuni mici prin măsurarea unei proprietăţi fizice sau aplicând o metodă chimică. Mai recomandabilă este urmărirea unei proprietăţi fizice care permite adoptarea unor dispozitive de automatizare.

Separarea unui amestec complex prin volatilizare impune folosirea unor coloane de fracţionare. Acestea sunt construite dintr-un număr de talere individuale, fiecare corespunzând unei etape de evaporare – condensare. Repetarea echilibrelor interfazice are drept consecinţă creşterea substanţială a eficienţei separării. Desfăşurarea procesului de separare, prin evaporări şi condensări repetate se poate explica prin intermediul ***diagramei de fază temperatură-compoziţie*** (figura 2).

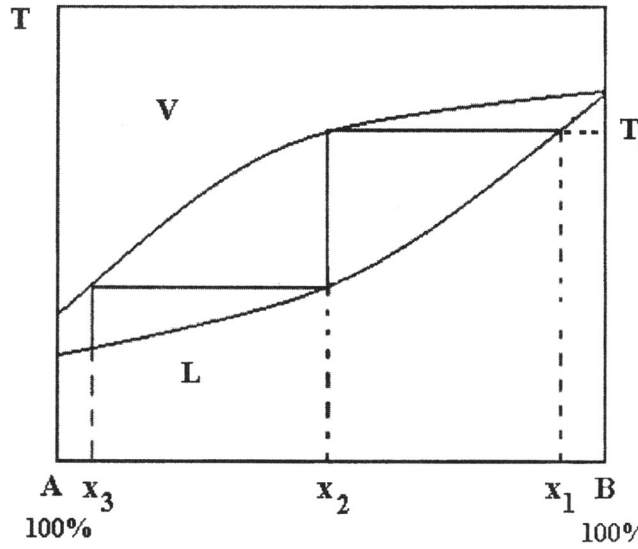


Figura 2. Diagrama de fază temperatură-compoziție.

Dacă un amestec format din doi componenți A și B de compoziție x_1 se încălzește la temperatura T_1, vaporii produși au compoziția dată de intersecția curbei de compoziție a vaporilor și izotermă, adică x_2.

Când vaporii sunt răciți se obține un lichid de aceeași compoziție, reprezentată prin intersecția verticalei cu curba de compoziție a lichidului. Astfel, lichidul de compoziție x_1 s-a schimbat într-un lichid de compoziție x_2 prin distilare.

Acest proces de deplasare din faza lichidă în stare de vapori și apoi din nou în stare lichidă reprezintă un taler. Continuând repetarea evaporărilor și condensărilor se produce un lichid mai bogat în component A și o fază de vapori îmbogățită în componentul B.

O coloană cu două talere produce un distilat cu compoziţie x_3, cu trei talere- o compoziţie x_4...etc.

O măsură a eficienţei coloanei este lungimea unui taler teoretic sau înălţimea echivalentă a unui taler teoretic. De menţionat că un taler teoretic în distilare nu are semnificaţie identică cu talerul teoretic din cromatografie, deşi literatura nu indică o explicaţie clară a diferenţei. Dacă lungimea coloanei este L, înălţimea unui taler este:

$$H=\frac{L}{N},$$

unde: N reprezintă numărul de talere teoretice.

Metoda propusă pentru calcularea numărului de talere teoretice presupune o distilare cu reflux total. Această distilare nu este practicabilă şi nici nu aduce vreun beneficiu, în afară de aspectul teoretic.În mod practic se aplică distilarea cu reflux parţial.

Separarea prin volatilizare se aplică cu precădere în domeniul chimiei organice şi mai rar pentru separările analitice în domeniul chimiei anorganice. Aceste metode permit determinarea unor constituenţi minori din amestecuri, deoarece necesită cantităţi mari de probe.

Avantajul separării prin volatilizare este legat de aplicaţiile metodei în scopuri preparative, rămânând cea mai simplă şi cea mai ieftină metodă. Dezavantajele sunt mari dacă o comparăm cu metodele moderne de separare:

1) nu este foarte selectivă;
2) nu permite separarea tuturor componenţilor;
3) se pot forma amestecuri azeotrope;
4) necesită cantităţi mari de probă;
5) unii compuşi sunt termic labili;
6) nu se poate adapta uşor unei tehnici cantitative.

5. EXTRACȚIA LICHID-LICHID

Prin extracție se înțelege transferul unei substanțe dizolvate dintr-un solvent în alt solvent nemiscibil (sau numai parțial miscibil) cu primul. În cazul unui amestec transferul se desfășoară în funcție de solubilitățile proprii fiecărui constituent în parte, în cele două faze lichide puse în contact.

Dacă la echilibru concentrațiile sunt sensibil diferite între cei doi solvenți ce constituie sistemul, procesul poate fi exploatat în scopul separării lor. Procesul extracției a înregistrat o extindere mare datorită avantajelor pe care le prezintă:

1. servește la purificarea substanțelor și la concentrarea lor;
2. se poate utiliza într-un domeniu larg de concentrații;
3. se poate executa în mod simplu;
4. necesită aparatură ușor accesibilă;
5. este foarte rapidă.

Extracția lichid-lichid se execută în 4 etape:

1) formarea speciei extractibile și punerea sa în contact intim (prin agitare) cu cele două faze ce constituie sistemul adoptat pentru extracție;
2) sedimentarea – separarea rafinatului de extract;
3) decantarea – izolarea rafinatului de extract;
4) determinarea componenților separați și eventual recuperarea solventului.

5.1. PARAMETRII PROCESULUI DE EXTRACȚIE

5.1.1. Constanta de repartiție

În mod obișnuit un sistem de extracție este constituit din apă și un solvent organic nemiscibil cu apa. În solvenții organici, cu o constantă dielectrică mică, speciile chimice se află în forme neionizate (molecule sau perechi ionice) în timp ce în faza apoasă predomină formele ionizate.

În cazul cel mai simplu, o substanță A, se repartizează în faza apoasă (aq) și cea organică (o), conform echilibrului:

$$(A)_{aq} \rightleftarrows (A)_0$$

Prin aplicarea legii acțiunii maselor rezultă ***constanta de repartiție*** sau ***coeficientul de repartiție, D***:

$$D = \frac{[A]_o}{[A]_{aq}} \qquad (1)$$

Parantezele drepte reprezintă concentrațiile molare ale speciei. Expresia este valabilă pentru concentrații mici; tărie ionică neglijabilă; temperatură constantă și în ipoteza în care se admite că variația cantităților speciei A nu afectează, în mod sensibil, solubilitatea reciprocă a celor doi solvenți.

Efectul cantitativ al electroliților asupra solubilității neelectroliților se exprimă prin relația lui Setchenow:

$$lg\,\gamma = lg\frac{S_{aq}}{S_e} = K \cdot \mu \qquad (2)$$

unde: γ = coeficient de activitate al neelectrolitului în soluția de electrolit; S_{aq} și S_e = solubilitățile neelectrolitului în apă și respectiv în soluția de electrolit;

K = constantă care depinde de neelectrolit şi de electrolit;
μ = tăria ionică a electrolitului, în soluţie apoasă.

Constanta de repartiţie a electrolitului va creşte în proporţia în care va descreşte solubilitatea sa în fază apoasă, adică:

$$D_e = \gamma \cdot D_{aq} \qquad (3)$$

unde: D_e şi D_{aq} - constantele de repartiţie pentru o soluţie de electrolit şi, respectiv apă.

În general solubilitatea neelectrolitului este mai mică într-o soluţie apoasă salină decât este în apă. Acesta este ***efectul de „salting-out",*** care se datorează micşorării cantităţii de apă „liberă" în prezenţa electrolitului. Aceasta se explică prin blocarea unor molecule prin hidratarea cationului electrolitului.

Creşterea valorii constantei de repartiţie produsă de fenomenul de „salting-out" are importante aplicaţii analitice, conducând la creşterea randamentului de extracţie.

5.1.2. Coeficientul de extracţie

Reprezintă raportul stoechiometric între sumele concentraţiilor tuturor speciilor prezente în cele două faze. Pentru un asemenea constituent, B, coeficientul de extracţie este:

$$E_B = \frac{\sum [B]_o}{\sum [B]_{aq}} \qquad (4)$$

Coeficienţii de extracţie sunt afectaţi, în principal de procedeele de ionizare, de oxido-reducere sau de

complexare în faza apoasă şi de fenomenele de asociere între moleculele de acelaşi fel, din fază organică.

5.1.3. Factorul de recuperare

Factorul de recuperare al unei substanţe extrase în n fracţiuni de solvent organic, cumulate după n extracţii are expresia:

$$R_n = \frac{Q_{extras}}{Q_{initial}} = 1 - \left(\frac{1}{E+1}\right)^n \qquad (5)$$

în cazul când volumele de faze sunt egale pentru fiecare extracţie (V_o=V_{aq}) şi cele două lichide sunt complet nemiscibile.

În cazul în care volumele fazelor puse în contact nu sunt egale, trebuie considerat raportul volumelor $\beta = \frac{V_o}{V_{aq}}$, iar ecuaţia (5) devine:

$$R_n = 1 - \left(\frac{1}{\beta \cdot E + 1}\right)^n \qquad (6)$$

Din punct de vedere analitic, se consideră o extracţie cantitativă, când factorul de recuperare este cel puţin 99,9 %. De remarcat că extracţia efectuată de mai multe ori cu volume mici de fază organică duce la o recuperare superioară comparativ cu o extracţie executată o singură dată cu un volum mare de solvent.

5.2. CLASIFICAREA SISTEMELOR DE EXTRACȚIE

Propunerile de clasificare ale sistemelor de extracție au la bază mai multe criterii, după cum urmează:

- clasificarea după compușii care se extrag;
- clasificarea în funcție de echilibrul de repartiție: sisteme ideale care permit aplicarea legii lui Nernst, sisteme neideale și sisteme mixte;
- clasificarea după natura extractanților: sisteme cu solvenți inerți; cu extractanți acizi; cu extractanți bazici, complexanți, ionici, etc

În cele ce urmează vom descrie sistemele de extracție în funcție de implicațiile în separările cu obiectiv analitic.

5.2.1. Specii simple

Acestea reprezintă sisteme în care există molecule, mai rar atomi, în ambele faze: apoasă și organică. Pentru extracția acestor specii se utilizează solvenți organici, de obicei inerți. Repartiția speciilor simple între cei doi solvenți nemiscibili, se realizează după legea lui Nernst, raportul coeficienților de activitate fiind foarte apropiat de unitate. Rezultate bune se obțin cu solvenți care nu conțin oxigen în moleculă ($CHCl_3$, CCl_4), deoarece aceștia în comparație cu solvenții oxigenați, au o tendință redusă de a extrage și alte specii coprezente.

5.2.2. Complecși metalici cu reactivi organici

Sub aspect analitic aceste sisteme sunt cele mai importante. Cei mai utilizați complecși de coordinație sunt cei neutri, în a căror moleculă, reactivul organic participă cu două grupări funcționale, astfel încât ionul metalic este înconjurat într-un ciclu de 5 sau 6 membri.

În extracția analitică a ionilor metalici cei mai frecvent utilizați sunt compușii care generează radicali organici hidrofobi. Ei înconjoară ionul metalic formând chelați, cu o solubilitate redusă în apă, dar solubili în solvenți organici. Pentru extracția chelaților metalici sunt preferați solvenți neoxigenați ($CHCl_3$), oferind valori foarte bune pentru coeficienții de extracție.

5.2.3. Perechi ionice

Acești compuși sunt niște agregate ionice numite asocieri ionice sau mai bine perechi ionice. Aceste perechi prezintă un grad de hidratare neînsemnat și în consecință sunt frecvent solubile în solvenți organici putând fi separate prin procedeul de extracție. Cei mai mulți dintre acești formatori de perechi ionice sunt de tipul R^+ sau RH^+. De exemplu, clorura de tetrafenil arsoniu se cuplează cu ionii voluminoși oxi- sau halogen-metal-complecși pentru a forma precipitate greu solubile în apă și ușor solubile în solvenți organici. Extractibilitatea perechilor ionice este dependentă de sarcina ionilor care se extrag și de natura solventului organic. Cationul de tetrafenilfosfoniu se comportă similar cu cel de tetrafenilarsoniu, având multiple implicații analitice.

5.2.4. Specii solvatate

Un ion se solvatează cu atât mai puternic, adică numărul de molecule legate și căldura degajată sunt cu atât mai mari, cu cât volumul ionului este mai mic și sarcina sa electrică mai mare. Moleculele de solvent se pot coordina la ionul de hidrogen al unui acid mineral sau al unui acid metal-complex și direct la cationul sării sau a compusului de asociere ionică.

Extracția unor asemenea specii se execută de obicei cu eteri prin formarea unei legături între hidrogenul complexului HMX_4 și atomul de oxigen bazic din eter.

O altă clasă importantă de solvenți o constituie cei care conțin oxigenul legat de fosfor. Puterea mare de solvatare a acestora se explică prin bazicitatea oxigenului din grupa fosforil (—P→O).

Un reprezentant tipic al acestei categorii de substanțe îl constituie tri-n-butilfosfatul (TBP). Acest solvent cu proprietăți deosebite de donor, se coordinează direct la cation și formează, de obicei compuși izolabili de compoziție bine definită.

Capacitatea sa de donor este atât de mare încât se poate utiliza ca extractant într-un solvent inert ca benzenul. TBP mai are calitatea unei disponibilități sterice bune, putând ocupa un număr variabil de poziții în sfera de coordinație a cationului.

De exemplu, la extracția Fe(III) din soluții de HCl concentrat formează specia: $H[FeCl_4(TBP)_2]$, iar din HCl diluat specia $H[FeCl_4(TBP)_3]$, în care TBP înlocuiește moleculele de apă coordinate, cu respectarea numărului de coordinație al Fe(III) egal cu șase.

Prin urmare, extractanții obișnuiți, care conduc la produși de solvatare, includ un atom de oxigen cu caracter bazic legat fie de un atom de C fie de un atom de P. Deosebirea între cele două categorii de extractanți se atribuie prezenței apei.

În sistemul de extracție cu esteri organo-fosforici, apa este eliminată din complexul extras în faza organică, în timp ce la extracția cu eteri sau cetone apa face parte din complex, având rol de punte între solvent și solut.

5.3. SISTEME DE EXTRACȚIE

5.3.1. Extracția chelaților metalici

O caracteristică a chelaților extrași constă din structura lor parțial anorganică (cationul) și parțial organică (anionul). Anionul organic ligand (L^-) reacționează cu cationul metalic (M^{n+}), formând un complex neîncărcat ML_n solubil în solvenți organici. Concomitent, se mai formează și alte specii complexe încărcate electric de tip ML^+_{n-1}, care prezintă solubilitate în apă și diminuează proporția extractibilității metalului. Echilibrul global de extracție este determinat de toate echilibrele care se desfășoară concomitent, principale sau secundare.

Din studiile experimentale întreprinse s-a constatat că: coeficientul de extracție depinde de valoarea constantei de extracție, de concentrația agentului chelatizant din faza organică și de pH-ul soluției apoase după expresia:

$$\lg E = \lg K_{ext} + n \cdot \lg[HL]_o^n + n \cdot pH \qquad (7)$$

Deci: logaritmul coeficientului de extracție este proporțional cu pH-ul, iar panta dreptei de variație lg E în funcție de pH este n. Valoarea pH-ului pentru lg E = 0 s-a notat cu $pH_{1/2}$:

$$pH_{1/2} = -\frac{1}{n} \cdot \lg K_{ext} - \lg[HL]_o^n \qquad (8)$$

Această mărime $pH_{1/2}$ reprezintă valoarea pH-ului la care se extrag 50 % din element, când volumele fazelor sunt egale. Dacă pH-ul este mai mare decât $pH_{1/2}$ atunci cea mai mare parte din metal se află în faza organică; iar dacă pH-ul

este mai mic decât $pH_{1/2}$ atunci cea mai mare parte se găseşte în faza apoasă.. Diferenţa între valorile $pH_{1/2}$ corespunzătoare a doi ioni metalici, constituie o măsură a separării lor.

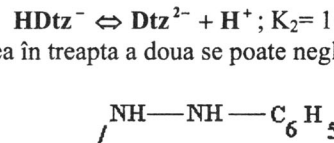
Principalii reactivi organici – agenţi de complexare, folosiţi pentru separare în scopuri analitice sunt următorii:

• **Difeniltiocarbazona (ditizona)** reacţionează cu ionii metalici formând complecşi puternic coloraţi, care se extrag în $CHCl_3$ sau în CCl_4 după care se procedează la măsurarea colorimetrică sau doar la separarea lor în scopul determinării prin alte metode. Solubilitatea ditizonei în apă este mică ($2 \cdot 10^{-7}$ m), dar, datorită caracterului său acid este solubilă în soluţie alcalină. Când o soluţie de ditizonă în CCl_4 (culoare verde) este amestecată cu soluţia apoasă a unui metal la o valoare de pH convenabilă, se formează Me-ditizonatul care se extrage în solventul organic luând o culoare caracteristică roşu-violet sau portocaliu. Ditizona este un acid bibazic:

$$\mathbf{H_2Dtz} \Leftrightarrow \mathbf{HDtz^-} + \mathbf{H^+};\ K_1 = 1{,}5 \cdot 10^{-5}$$

$$\mathbf{HDtz^-} \Leftrightarrow \mathbf{Dtz^{2-}} + \mathbf{H^+};\ K_2 = 1 \cdot 10^{-15}$$

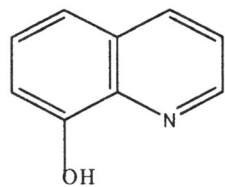
Ionizarea în treapta a doua se poate neglija.



Elementele care se pot extrage ca ditizonaţi în $CHCl_3$ sau CCl_4 sunt: Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Au, Hg, Tl, Pb, Bi.

În stări de oxidare joase se pot extrage: ruteniu, rodiu, osmiu iar germaniul numai în absenţa apei.

• **8-Hidroxichinolina (oxina)**. Reactivitatea mare a oxinei se datorește posibilității formării combinațiilor complexe interne cu cicluri de 5 atomi, prin înlocuirea hidrogenului de la gruparea fenolică și prin coordinarea la azot.



Nu este un reactiv selectiv, deoarece reacționează cu un număr foarte mare de elemente. Selectivitatea se poate însă mări fie prin modificarea pH-ului, fie prin introducerea în molecula oxinei a unei grupări metil sau halogen în poziția orto sau para față de gruparea fenolică, care intervin prin efecte de natură sterică. Extracția este aproape cantitativă în intervalul de pH = 6-9. Literatura de specialitate arată că folosind 50 mL soluție apoasă 0,06 % (0,004 m) în oxină extrasă cu 10 cm^3 $CHCl_3$ după agitare timp de 1 minut se pot extrage cantitativ sub formă de oxinați metalici în cloroform următoarele elemente:

Metal	Interval pH
Mo(VI)	2-5,6
Ni	5,5-8,8
Nb	2,8-10,5
Th	7,5-9,5
Ti	4-9
U(VI)	7-9
V(V)	3-5
W(VI)	3-4,3

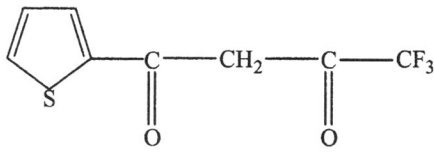
Metal	Interval pH
Al	4,5-10,7
Cr(III)	6-8
Co	7,3-8,2
Cu	2,8
Ga	3-11,7
Fe(III)	2,4
Pb	8,2-11
Mn(II)	9-10,5

Foarte recent s-a realizat extracția Me bivalente separându-le de cele trivalente prin modificarea reactivului şi anume prin introducerea unor grupări voluminoase în poziția 7 a 8-hidroxichinolinei.

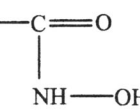
- **β-Dicetone**

În forma enolică β-dicetonele posedă un atom de H ionizabil, care poate fi înlocuit cu un ion metalic, şi un atom de oxigen cetonic, ce poate da naştere la o legătură covalent-coordinativă. Solvenții uzual folosiți sunt: CCl_4, $CHCl_3$, C_6H_6 şi xilen. Separări la scară micro s-au realizat cu ajutorul acetilacetonei.

- **Tenoiltrifluoracetona (TTA),** este folosită la separarea actinidelor.

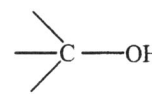


- **Acizii hidroxamici,** conţin gruparea:



şi pot avea unul sau doi radicali alchil sau aril în moleculă.

- **Nitrozofenolii şi nitrozonaftolii.** Moleculele acestor reactivi conţin gruparea:



cuplată cu gruparea –N=O, fiind extractanţi complexanţi selectivi pentru anumiţi ioni metalici: Co, Fe, U(VI), Pd, Th cu care formează complecşi coloraţi.

- **Hitrozoarilhidroxilaminele.** Combinarea unei grupe oximă cu o grupă nitrozo pe un radical aril conduce la formarea unor agenţi complexanţi cum sunt: N-nitrozofenilhidroxilamina sau N-nitrozonaftilhidroxilamina. Sărurile lor de amoniu: cupferonul şi neocupferonul dau chelaţi greu solubili în soluţii de acizi minerali $\simeq 1$ n care pot fi extraşi în $CHCl_3$. Astfel se pot extrage elementele: Fe(III), Ga, Sb(III), Ti(IV), Sn(IV), Hg, Zr, V(V), U(IV) şi Mo(VI).

5.3.2. Extracţia amino-compuşilor

Extracţia cu solvenţi a compuşilor cu baze organice prezintă interes datorită aplicaţiilor cu randamente bune la separarea şi recuperarea unor metale din combustibili iradiaţi precum şi datorită selectivităţii la izolarea speciilor

anionice simple sau complexe. Aminele utilizate în extracția L–L trebuie să se caracterizeze prin următoarele proprietăți:

- capacitate de extracție bună;
- solubilitate redusă în fază apoasă;
- stabilitate chimică;
- compatibilitate cu diluanții;
- separare rapidă a fazelor.

Aceste condiții sunt îndeplinite numai de aminele cu M mare și care conțin atomul de azot saturat. Cele mai frecvent utilizate în extracția cu solvenți nemiscibili sunt:

tri-n-octilamina (TnOA) pentru: $MnCl_4^{2-}$; $NiCl_4^{2-}$; UCl_6 în toluen.

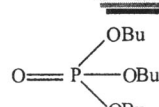
triizooctilamina (TiOA) pentru: $CuCl_4^{2-}$; $FeCl_4^-$; $CoCl_4^{2-}$ în toluen.

trilaurilamina (TLA) pentru: $ZnCl_4^{2-}$; $BiCl_5^{2-}$; $Hg(NO_3)_3]^-$ în o-xilen.

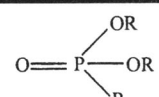
trihexilamina (THA) pentru: $FeCl_4^-$; $CoCl_4^{2-}$; $Fe(C_2O_4)_3]^{3-}$; $Ni(C_2O_4)_2]^{2-}$ în benzen.

5.3.3. Extracția compușilor organo-fosforici

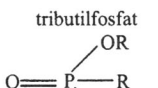
În ultimul timp, au fost mult studiați derivații acidului organo-fosforic, datorită calităților lor de extractanți cu capacități foarte bune de extracție realizate cu viteze mari de execuție. Aceste investigații au fost impulsionate de utilizarea esterului tri-n butilfosfatul (TBP) ca reactiv de extracție pentru elementele rare în mod special. Din studiile întreprinse recent, s-a constatat că selectivitatea TBP-ului crește prin diluare cu un solvent inert hidrocarbonat. Dacă gruparea BuO- din TBP este înlocuită cu gruparea Bu- sau alte grupări alchil (R), polaritatea legăturii O-P se accentuează și coeficientul de extracție crește odată cu puterea de solvatare, în ordinea următoare:



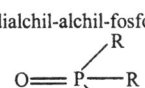
tributilfosfat



dialchil-alchil-fosfonat



alchil-dialchil-fosfinat



trialchil-fosfin-oxid

Cele mai bune rezultate se obţin actualmente pentru extracţia: U(VI), Ce(IV), Plutoniu(IV), Th şi Zr din soluţii acide clorhidrice sau azotice 1 m folosind Tri-n-octilfosfina $O=P(C_8H_{17})_3$ în ciclohexan sau în CCl_4.

5.3.4. Extracţia halogenurilor metalice

Halogenurile metalice cu caracter covalent prezintă o extractibilitate ridicată, atât în solvenţii polari cât şi în cei nepolari. S-a constatat că se extrag foarte bine anionii complecşi protonaţi, de preferinţă monovalenţi, ai metalelor tranziţionale bivalente şi trivalente, în solvenţi conţinând un atom de oxigen donor, legat de atomul de carbon.

Un exemplu clasic de separare prin extracţie de acest tip îl constituie extracţia Fe(III) cu dietileter. Extractibilitatea fierului creşte odată cu concentraţia în HCl până la 6,5 m, în consecinţă cu formarea complexului $FeCl_4^-$ şi descreşte cu disocierea speciei extrase ($HFeCl_4$). Peste 6,5 m extracţia Fe(III) descreşte, deoarece eterul etilic devine miscibil cu faza apoasă.

Extracţia fierului cu eter izopropilic prezintă unele avantaje comparativ cu eterul etilic (p.f.= 34,5 ^{0}C), deoarece este mai puţin volatil (p.f.= 68 ^{0}C) şi mai puţin solubil în HCl, permiţând extracţia în intervalul 7,75-8 m.

Extracția cu eterul izopropilic permite separarea Fe(III) de Cu, Co, Mn, Ni, Zn, Al, Cr, Ti. Extracții ale clorocomplecșilor sunt posibile și cu alți solvenți oxoniu. Astfel, cu volume egale de fază M.I.C. (metil, izobutil- cetona) se extrage 99,99 % Fe(III) printr-o singură extracție din HCl 7 m. Extractanți și mai eficienți sunt tributilfosfatul și triamilfosfatul deoarece extrag fierul din HCl 8 m în proporție de 99,9999 %.

Din soluții de HBr 4 m eterul etilic extrage circa 99 % elementele: Tl(I), Tl(III), In(III), Au(III), Sn(IV,VI) și Fe(III).

Din soluții de HI 7 m același solvent extrage: Sb(III), Hg(II), Cd, Au(III) și Sn(II) ca iodoacizi. Dintre fluoruri, prezintă interes analitic extracția elementelor niobiu și tantal, în solvenți eterici.

5.4. PROCEDEE DE EXTRACȚIE

După sensul de curgere al lichidului și după principiul de funcționare al instalației, se deosebesc 3 procedee generale de extracție: ***extracția simplă***, ***continuă*** și în ***contracurent***.

5.4.1. Extracția simplă

Se poate realiza în contact unic sau contact multiplu, cu o aparatură simplă. Pâlniile de separare pot servi foarte bine atât pentru amestecare cât și la separarea fazelor. Ele se folosesc pentru mărimi cuprinse între mg și g.

Să considerăm separarea a două elemente A și B prin extracție cu un solvent nemiscibil și cu un anumit reactiv astfel ales încât A să fie mai extractibil decât B.

Se urmărește o valoare foarte apropiată de unitate pentru factorul de recuperare R_A și o valoare tinzând către

zero pentru R_B. De obicei, pentru o bună analiză R_A este fixat la o valoare de 0,999 dacă A este un constituent major al probei. După aceea se apreciază numărul de extracţii astfel încât să se obţină o valoare cât mai mică pentru R_B.

R_A este determinat de coeficientul de extracţie, E_A, de volumul relativ al fazelor şi de numărul succesiv de extracţii. În mod similar este determinat şi R_B.

Cu cât raportul (E_A/E_B) este mai mare cu atât va fi mai uşoară şi mai eficace separarea (exprimată prin factorul de separare $S_{B/A}=R_B/R_A$).

Dacă se acceptă ca valoare satisfăcătoare pentru factorul de recuperare R_A valoarea 0,999, factorul de separare $S_{B/A}$ = 0,003 după trei extracţii succesive.

Practic se apelează la metode care să reducă coeficientul de extracţie E_B fără să afecteze prea mult coeficientul de extracţie E_A. Pentru aceasta se folosesc agenţi de complexare diferenţiali convenabili pentru a transforma pe B într-o specie nereactivă sau puţin reactivă.

De exemplu: Pb formează o cianură complexă mult mai puţin stabilă decât Zn sau alte metale, ceea ce face posibilă extracţia sa cu ditizonă în prezenţa acestora, dacă se adaugă cianura în cantităţi suficiente.

De asemenea, schimbarea stării de oxidare a lui B poate elimina extracţia sa. Astfel, extracţia ferului sub formă de Fe(III)- chelaţi se poate preveni prin reducerea la Fe(II) fie cu acid ascorbic, fie cu clorură de titan(III).

Extracţia simplă cu contact multiplu (extracţia în echicurent) se realizează prin introducerea cantităţii de extractant selectiv în porţiuni mici, succesive, în rafinat.

Extracţia simplă se realizează cu ***extractorul Soxhlet***. Solventul volatil condensează în exterior, curge în balon antrenând substanţa de extras şi de aici este reciclat (prin evaporare, condensare, etc.).

5.4.2. Extracţia continuă

Se aplică când coeficientul de extracţie al substanţei care interesează este mic. În principiu, procedeul impune menţinerea unui volum constant de extractant, care este reciclat. Când extractantul este un solvent uşor (mai puţin dens ca faza extrasă), se foloseşte ***aparatul Fridrich,*** iar când extractantul este un solvent greu (mai dens ca faza apoasă) se foloseşte ***microextractorul Wehrli.***

Principiul de funcţionare în ambele aparate este următorul: un volum limitat de solvent organic extractant este trecut sub formă de picături în mod continuu prin soluţia apoasă. Extractantul este încălzit şi reîntors în ciclu unde are loc contactarea cu faza de rafinat şi colectarea în rezervor.

5.4.3. Extracţia în contracurent

Prin metodele de extracţie simplă, descrise până acum, nu se separă în mod cantitativ două substanţe ale căror coeficienţi de extracţie diferă printr-un factor mic. Pentru asemenea constituenţi se recomandă o extracţie sistematică, prin metodele de extracţie în contracurent.

În cea mai simplă metodă de acest tip se folosesc o serie de pâlnii de separare plasate într-un aparat, care transferă în mod automat una dintre faze din pâlnie în pâlnie, după atingerea echilibrului interfazic.

În principiu, o extracţie în contracurent, conducând la separarea a doi componenţi A şi B într-o serie de pâlnii r_1, r_2....., etc., decurge în felul următor: fiecare pâlnie conţine un volum fix de fază organică, să presupunem mai grea decât faza apoasă.

În pâlnia r_1 se introduce soluţia apoasă conţinând componenţii A şi B de separat. După agitarea şi separarea

fazelor faza apoasă din pâlnia r_1 este transferată în pâlnia r_2, înlocuindu-se cu un volum egal de soluție apoasă (neconținând A și B) și având o anumită compoziție pentru realizarea coeficienților de extracție doriți pentru A și B. Conținutul ambelor pâlnii este amestecat, iar faza apoasă din pâlnia r_2 este transferată în pâlnia r_3, aceea din pâlnia r_1 în pâlnia r_2 pe când în pâlnia r_1 se introduce un nou volum de soluție apoasă. Procesul se repetă mereu iar pe măsură ce numărul de transferuri crește, maximul fracțiunii extrase se deplasează spre ultima pâlnie de separare.

În concluzie, prin extracția simplă recuperarea este mai mare pentru ambii solvenți dar separarea nu este prea bună, constatându-se cantități mari de B în A. În contracurent, recuperarea componentelor este inferioară, dar puritatea lui A este mult mai mare. Pentru extracția analitică, ultima este mai importantă, deși rezultatele obținute prin metoda cromatografică rămân superioare. Extracția cu solvenți este eficientă când coeficientul de extracție E_A diferă de E_B printr-un factor de 10^4 sau mai mult.

5.5. Concentrarea prin extracție

Concentrarea elementelor simultan cu separarea lor, folosind extracția, permite mărirea sensibilității metodelor instrumentale de analiză și evitarea interferențelor componentelor coprezente. Concentrarea microelementelor prin procedeul extracției se poate realiza fie prin extracția acestora în faza organică, elementul în proporție majoră rămânând în faza apoasă, fie în mod invers. Ambele procedee prezintă avantaje și dezavantaje.

Extracția se folosește atât în sensul unei concentrări absolute, respectiv trecerea substanței dintr-un volum mare într-un volum mic de soluție, cât și în sensul unei

concentrări relative, respectiv prin modificarea favorabilă a raportului dintre macro- şi micro-componenţi.

Metoda concentrării prin extracţie se cuplează de obicei cu determinarea ulterioară a elementului separat. Uneori natura organică a concentratului este avantajoasă, cum este cazul folosirii fotometriei de flacără şi absorbţiei atomice, care necesită pulverizarea directă a extractelor mărindu-se astfel sensibilitatea determinărilor. În alte cazuri, natura organică a concentratului trebuie evitată, ceea ce conduce implicit la pierderi şi impurificări ale elementelor de determinat.

5.5.1. Factorii care influenţează concentrarea prin extracţie

a) Prezenţa macrocomponentului

Componentul care se găseşte într-o proporţie majoră influenţează procesul de concentrare prin extracţia microelementelor chiar dacă este inert, deoarece modifică caracteristicile de extracţie ale acestora. Astfel, deplasarea echilibrului de extracţie poate avea loc într-un sens sau altul, în funcţie de caracteristicile mediului: spre exemplu anionul extractibil.poate masca microcomponentul prin formarea unui complex neextractibil sau dimpotrivă, sarea macrocomponentului poate induce un efect de salifiere care intensifică procesul de extracţie.

Pe de altă parte, se constată influenţa electroliţilor şi asupra parametrilor cinetici de extracţie cum este de exemplu, efectul ionului tiocianic, care măreşte viteza de extracţie din benzen a urmelor de Fe(III) cu tenoiltrifluoracetonă.

Prezenţa macrocomponentului mai poate influenţa extracţia microcomponentului şi prin substituirea sa în combinaţia complexă extractibilă. Din acest motiv s-au

întocmit serii de substituţie pe baza constantelor de extracţie a mai multor elemente, în care fiecare element precedent substituie în complecşii corespunzători elementele ce urmează după el.

În cazul concentrării relative a microelementelor, prin extracţia cantitativă a macrocomponentului din faza apoasă trebuie considerată influenţa reciprocă a elementelor. Astfel, la extracţia acizilor complecşi ai metalelor se întâlneşte frecvent fenomenul de ***coextracţie***. De exemplu: extracţia Fe(III) cu eter dietilic este însoţită de coextracţia elementelor In(III), Sn(IV) şi Sb(V). Explicaţia constă în formarea unor asociaţii mixte în faza organică care includ macro şi microelementul de acelaşi tip ($H^+FeCl_4^-$ + $H^+InCl_4^-$). Prin folosirea unor solvenţi cu constantă dielectrică mare se constată fenomenul invers, de inhibare a extracţiei microcomponentului, în prezenţa macrocomponentului extras, fenomen explicat prin disociere. Această situaţie duce la micşorarea coeficientului de extracţie.

b) Concentraţia macrocomponentului

Influenţează valoarea coeficientului său de extracţie, şi prin urmare eficienţa separării şi concentrării.

c) Concentraţia microcomponentului

Influenţează tot valoarea coeficientului de extracţie. Din studiile întreprinse s-a constatat că acesta rămâne invariabil când concentraţiile microelementului sunt mai mici de 10^{-3} m.

d) Concentraţia reactivului de extracţie

Concentrarea prin extracţie a microcomponentului este dependentă de cantitatea de reactiv introdusă în probă, în măsura în care coeficientul de extracţie al acestuia este diferit de cel al macrocomponentului. În cazul în care coeficientul de extracţie al microcomponentului este mai mare, se recomandă introducerea unei cantităţi

substoechiometrice de reactiv raportată la macroelement. Procedând astfel, microelementul se extrage cantitativ în timp ce macroelementul este extras în proporţie neglijabilă.

În caz contrar, dacă se introduce reactiv mult se extrage macrocomponentul iar microelementul rămâne în faza apoasă. Eficienţa separării şi concentrării rămâne cu atât mai mare cu cât diferenţa între constantele de extracţie este mai mare.

5.6. EXTRACŢIA SINERGETICĂ

Termenul de sinergism (provenit din biologie şi constatat la administrarea medicamentelor) defineşte acţiunea combinată a doi sau a mai mulţi agenţi, superioară acţiunii lor individuale. Acest fenomen a fost observat relativ recent, cu ocazia extracţiei unor elemente ale pământurilor rare într-un amestec constituit din ***tributil-fosfat şi tenoiltrifluoracetonă*** în cherosen.

Sinergismul în extracţie se concretizează prin creşterea valorii coeficientului de extracţie, când se foloseşte un amestec de extractanţi A şi B, care nu reacţionează între ei, dar pot să extragă separat o specie M, pentru a forma speciile MA şi MB sau pot forma împreună un compus MAB.

Considerarea cantitativă a fenomenului de sinergism se realizează prin ***coeficientul sinergic*** (C.S) definit prin raportul:

$$C.S = lg \frac{E_{AB}}{E_A + E_B} \qquad (9)$$

unde: E_A şi E_B – coeficienţii de extracţie ai speciei metalice în extractanţii A şi B; E_{AB} – coeficientul de extracţie obţinut în amestecul de extractanţi A şi B.

Prin urmare, ***coeficientul sinergic*** include saltul coeficientului de extracție peste valoarea obținută din aditivitatea valorilor individuale. Sinergismul este pozitiv când coeficientul sinergic înregistrează o exaltare pozitivă și este negativ sau antagonic când se constată un regres al coeficientul de extracție global sub valoarea sumei valorilor individuale.

5.6.1. Mecanismul extracției sinergice

A suscitat mai multe discuții. În principiu acesta se consideră legat de apariția unui complex care conține specia metalică și cei doi extractanți. Formarea acestuia este dependentă de doi factori fundamentali:

a. capacitățile de extracție ale extractanților în amestec sunt modificate în situația coprezenței lor;

b. compoziția speciei metalice extrasă în faza organică este deosebită când se folosește amestecul de extractanți.

Pentru prevederea obținerii sinergismului sunt stabilite actualmente următoarele reguli generale:

1) unul din extractanții activi să fie capabil să neutralizeze sarcina ionului metalic, de preferință formând un chelat.

2) cel de-al doilea extractant să poată deplasa apa reziduală de coordinație a complexului metalic neutru, micșorându-i caracterul hidrofil;

3) al doilea extractant să nu fie hidrofil și să fie mai slab coordinat;

4) numărul de coordinație al metalului să fie favorabil;

5) extractanții să prezinte forme structurale care să genereze împiedicări de natură sterică.

Din studiile efectuate asupra sistemelor sinergetice s-a constatat că valoarea constantei de echilibru este influenţată de bazicitatea şi, în unele cazuri,de structura ligandului neutru. Din valorile constantelor de echilibru de extracţie (K_{ext}) s-a dedus că accentuarea efectului sinergetic este proporţională cu creşterea bazicităţii ligandului donor, de exemplu în ordinea fosfat< fosfonat< fosfinat< fosfin oxid. De asemenea, capacitatea de extracţie s-a constatat că descreşte odată cu amplificarea ramificării lanţurilor alchil.

Extractibilitatea aducţilor sinergetici este, de asemenea, influenţată de diluantul întrebuinţat şi anume sinergismul este cu atât mai accentuat cu cât este mai mică solubilitatea în apă, respectiv polaritatea mai scăzută.

Extracţia sinergetică este influenţată favorabil dacă ionul metalic are capacitate mare de coordinare şi raza ionică mică. De asemenea, agentul complexant intervine asupra efectului sinergetic prin capacitatea de complexare, în sensul că, cu cât complexul metalic este mai stabil, cu atât se constată o tendinţă mai mică în formarea aductului sinergetic prin legarea celui de-al doilea extractant neutru la metal.

Coeficientul de extracţie în prezenţa unui efect sinergetic depinde de constanta de formare a aductului (β) şi de concentraţia în ligand (L) după relaţia:

$$lg\frac{E}{E_0} = \sum_{1}^{l} \beta_l [L]_0^l \qquad (10)$$

unde E_0 reprezintă valoarea coeficientului de extracţie E la l=0 (l - număr de liganzi).

Sistemele de extracţie sinergetică includ agenţi de chelatizare, compuşi acizi organofosforici şi liganzi neutri.

Cei mai importanţi agenţi de chelatizare generatori de efect sinergetic sunt β- dicetonele dintre care în mod curent se foloseşte tenoiltrifluoracetona (TTA).

6. SEPARAREA ÎN PREZENȚA SCHIMBĂTORILOR DE IONI

În prezența schimbătorilor de ioni, separarea are loc, pe baza unui echilibru interfazic de schimb ionic care se desfășoară între o fază staționară constituită din schimbătorul de ioni și o fază mobilă lichidă.

Schimbătorii de ioni sunt polimeri sau materiale cu masa moleculară mare insolubile dar permeabile pentru soluția cu care vin în contact.

Scheletul polimeric sau matricea poartă grupe funcționale fixe, a căror sarcină electrostatică este neutralizată de ioni mobili, numiți contraioni. Aceștia se pot schimba cu ioni de sarcină similară, prezenți în soluția salină înconjurătoare.

În funcție de natura grupării funcționale, schimbătorii de ioni sunt clasificați în ***cationici***, caracterizați prin grupe acide: $-SO_3H$; -COOH; -OH (fenolic) și ***anionici***, având grupări bazice: $-NH_2$; $-NH(CH_3)$;$-N(CH_3)OH$.

În chimia analitică o mai mare importanță o au rășinile puternic acide (sulfonice) sau puternic bazice (amine cuaternare) deoarece funcționează pe un interval larg de pH.

6.1. PROPRIETĂȚILE FIZICO-CHIMICE ALE SCHIMBĂTORILOR DE IONI

Umflarea. Proporția ridicată a grupelor polare ce se găsesc în structura rășinii îi conferă acesteia un caracter higroscopic pronunțat. Gradul de umflare al rășinii depinde de gradul de reticulare și de flexibilitatea catenelor. La un grad înalt de reticulare umflarea rășinii este mică.

Îmhibarea răşinii practic nu variază când schimbul ionic se face între ioni de aceeaşi valenţă, dar gradul de îmhibare scade când se înlocuiesc ioni monovalenţi din răşină cu ioni polivalenţi din soluţie. Îmbibarea răşinii cu diverşi solvenţi neapoşi depinde, ca şi în cazul apei, pe de o parte de afinitatea între moleculele solventului şi grupările funcţionale ale răşinii, iar pe de altă parte de afinitatea solventului faţă de ionul schimbabil al răşinii.

Forţele osmotice care conduc apa din exterior în interiorul granulelor de răşină, cauzează o enormă presiune internă sub acţiunea căreia are loc umflarea răşinii. Acesta este motivul pentru care umplerea coloanelor nu se va face cu răşină uscată deoarece la trecerea prin coloană a eluentului se va produce o „defectare" a coloanei de sticlă.

Capacitatea de schimb. Reprezintă cantitatea totală de ioni, exprimată în miliechivalenţi-gram (mval/g), pe care un gram de răşină o poate schimba cu ionii din soluţie; este corelată cu numărul grupelor funcţionale disociabile din scheletul răşinii. Experimental, această mărime se poate estima prin determinarea ionilor de H^+, respectiv de OH^- dintr-o cantitate cunoscută de răşină.

Determinarea se poate efectua direct pe o cantitate cunoscută de răşină, în prezenţa unei soluţii de NaCl, utilizând ca senzor instrumental un electrod de sticlă. Capacitatea de schimb a schimbătorului se calculează din cantitatea (mvali) de NaOH, respectiv de HCl necesară atingerii punctului de echivalenţă.

Pentru realizarea titrării va trece totuşi un timp destul de lung, deoarece echilibrul între cele două faze se stabileşte încet. Pentru accelerarea stabilirii echilibrului se recomandă adăugarea unei sări în soluţia salină, care va aduce după sine şi un salt mai mare de pH la punctul de echivalenţă.

6.2. SELECTIVITATEA ŞI ECHILIBRUL DE SCHIMB AL SCHIMBULUI IONIC

6.2.1. Selectivitatea

Procedeele de separare prin schimb ionic se bazează pe selectivitatea schimbătorului de ioni, adică pe selecţionarea preferenţiată a unor contraioni în defavoarea altora, coprezenţi în soluţia înconjurătoare.

Un schimbător cationic reţine ionii în funcţie de natura lor. În general sunt fixaţi mai puternic ionii cu sarcină superioară: M(IV)> M(III)> M(II)> M(I). Dacă ionii sunt hidrataţi ordinea de retenţie creşte odată cu micşorarea volumului ionului hidratat. De exemplu pentru o serie de ioni având aceeaşi sarcină, ordinea selectivităţii prezentată de o răşină cationică (Dowex 50) este:

$Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+} > Be^{2+}$

$Ag^{+} > Tl^{+} > Cs^{+} > Rb^{+} > NH_4^{+} > K^{+} > Na^{+} > H^{+} > Li^{+}$

iar pentru o răşină anionică (Dowex 1) este:

$NCS^{-} > I^{-} > NO_3^{-} > Br^{-} > CN^{-} > HSO_3^{-} > NO^{-} > Cl^{-} > HCO_3^{-} > CH_3COO^{-} > HO^{-}$

Selectivitatea schimbătorilor pentru ionii organici este, în general, mai greu de anticipat. Fixarea bazelor sau a acizilor slabi depinde de tăria acestora şi de pH. Dimensiunile ionilor, de asemenea influenţează, fiind evident că ionii mari nu pot pătrunde într-o răşină cu un grad mare de reticulare.

S-a observat totodată influenţa pe care o manifestă matricea răşinii pentru reţinerea prioritară a anumitor soluţi. De exemplu, speciile conţinând cicluri benzenice sau alte sisteme aromatice sunt mai puternic reţinute comparativ cu cele nearomatice pe o răşină de tip polistirenic.

În concluzie, un schimbător va prefera schimbarea contraionilor care prezintă următoarele caracteristici:

- ➔ sarcină mai mare;
- ➔ volum echivalent de solvatare mai mic;
- ➔ polarizabilitate mai mare;
- ➔ interacţii mai puternice cu grupa funcţională fixă sau cu matricea răşinii;
- ➔ legături slabe cu co-ionul.

Un alt grup de parametri care pot influenţa echilibrul de schimb ionic este generat de soluţia înconjurătoare şi se manifestă prin: concentraţie, pH, tăria ionică, constanta dielectrică, prezenţa agenţilor de complexare.

Prezenţa în soluţia înconjurătoare a unor ioni de dimensiuni foarte mari capabili de a forma perechi ionice cu contraionii, a dus la o metodă de separare apreciată datorită posibilităţilor analitice care le furnizează în cadrul cromatografiei cu schimbători de ioni, ceea ce a făcut posibilă separarea simultană a mai multor tipuri de specii chimice coprezente ionizate şi moleculare.

6.2.2. Echilibrul de schimb ionic

Schimbul ionic poate fi privit ca o reacţie de dublu schimb ce are loc în proporţie stoechiometrică, între ionii din soluţie şi ionii conţinuţi de răşină. Schimbătorul de ioni primeşte selectiv anumite specii de ioni, conform reacţiilor:

$$R^-H^+ + Na^+ \rightleftarrows R^-Na^+ + H^+$$

$$2R^-H^+ + Ca^{2+} \rightleftarrows R_2^-Ca^{2+} + 2H^+$$

$$R^+Cl^- + OH^- \rightleftarrows R^+OH^- + Cl^-$$

unde R^+ şi R^- reprezintă matricea răşinii.

Reacţia de schimb între doi ioni de aceeaşi sarcină se poate reprezenta prin următorul echilibrul:

$$R^-A^+ + B^+Y^- \rightleftarrows R^-B^+ + A^+Y^-$$

unde: R reprezintă răşina; A şi B reprezintă contraionii; Y reprezintă co-ionul.

Acest ultim echilibru implică trei procese care îi determină viteza:

1) difuzia ionilor B^+ către suprafaţa particulei de răşină şi simultan difuzia ionilor A^+ spre suprafaţă, către soluţie,.

2) difuzia ionilor B^+ în răşină şi difuzia lui A^+ în afara răşini. De menţionat că în această etapă un rol important îl are gradul de reticulare;

3) înlocuirea lui A^+ cu B^+ în centrii activi. Acest ultim proces este foarte rapid.

Viteza de schimb ionic este, prin urmare, un proces de difuziune controlată, cu un factor limitativ constituit din transferul ionic prin „filmul Nernst" existent pe suprafaţa particulelor.

Constanta echilibrului de schimb sau, aşa cum se mai numeşte ***factorul de separare***, pentru o anumită tărie ionică şi încărcare a răşinii, indică gradul în care un ion este preferat în procesul de schimb, comparativ cu un alt ion şi este dat de expresia:

$$K_B^A = \frac{[B^+]_R[A^+]_S}{[A^+]_R[B^+]_S} \qquad (1)$$

unde prin [ ]R şi [ ]S se precizează concentraţiile molare în faza răşină şi respectiv soluţie.

În general constanta de schimb K_B^A nu are o valoare constantă deoarece variază cu coeficienţii de activitate din interiorul şi din exteriorul răşinii.

Se ştie că ***„coeficientul de distibuţie" (D)*** al unui component (B) se exprimă prin raportul concentraţiilor sale la echilibru în faza răşină şi în soluţie:

De exemplu: $D_B = \frac{[B^+]_R}{[B^+]_S}$ (2)

Înlocuind în expresia constantei de schimb aceasta devine:

$$K_B^A = D_B \cdot \frac{[A^+]_S}{[A^+]_R} \quad (3)$$

sau altfel scris:

$$D_B = K_B^A \cdot \frac{[A^+]_R}{[A^+]_S} \quad (4)$$

Când în soluţie sunt prezente şi alte forme ale speciei B, cum sunt compuşii hidrolizaţi sau complecşi cationici, anionici sau neutri, coeficientul de distribuţie devine:

$$D_B = \frac{[B^+]_R}{\sum [B^+]_S} \quad (5)$$

D_B are o valoare constantă, independentă de concentraţia din soluţie, dacă contraionul A se află într-o proporţie net superioară. Aceeaşi condiţie este îndeplinită când specia B se află la nivel de urme.

Reprezentarea grafică a variaţiei concentraţiei componentei în faza răşină funcţie de concentraţia componentei în soluţie reprezintă ***curba de distribuţie***. Panta acestei drepte determină valoarea ***coeficientului de distribuţie (D)***. Reprezentarea grafică prin curbe de

distribuţie oferă sugestii importante în vederea realizării de separări analitice.

6.2.3. Distribuţia în prezenţa agenţilor de complexare

Cel mai utilizat mod de a creşte selectivitatea constă din perturbarea echilibrului de simplu schimb ionic, prin introducerea unor reactivi formatori de complecşi ionici sau neutri cu unul sau mai mulţi dintre ionii de separat.

Agenţii de complexare se pot utiliza, în principal, în două moduri diferite:

a. pentru extragerea selectivă a ionilor metalici, după fixarea lor pe o răşină cationică prin formarea de complecşi cu stabilităţi descrescătoare;

b. pentru formarea de complecşi anionici şi reţinerea lor selectivă pe răşini anionice, în funcţie de stabilităţile lor crescătoare.

Datorită importanţei sale, studiul separării complecşilor cloro-ionici pe un schimbător puternic bazic a fost extins la foarte multe elemente, fiecare prezentând o anumită comportare caracteristică.

Datele obţinute au dus la următoarea clasificare:

a. metale care nu se fixează pe răşini anionice la nici o concentraţie de HCl: alcaline, alcalino-pământoase, Al, Y, lantanide, Ac, Th, Ni.

b. metale slab fixate (D< 10): Sc, Ti(III), V(IV), Cr(III), Mn, Tl(I).

c. metale moderat fixate (D= 10- 100): Ti(IV), Fe(II), Co, Cu(II), Ge, As, Se, Mo, Rh(III), In, W(VI), Ir(III), Pb.

d. metale puternic fixate (D > 100): V(V), Cr(VI), Fe(III), Cu(I), Zn, Ga, Zr, Ru, Rh(IV), Pd, Ag, Cd, Sn(IV), Sb, Pt, Au, Hg, Bi, Po, U(VI).

Esența separării prin schimb ionic, în prezența agenților de complexare constă în modificarea valorilor coeficienților de distribuție, în funcție de gradul de alternare al sistemului inițial de echilibru.

Din numeroasele studii întreprinse s-a constatat că coeficientul de distribuție (D) variază invers proporțional cu concentrația în reactivul complexant, și anume cu atât mai mult cu cât complecșii formați sunt mai stabili. În consecință, prezența agenților de complexare furnizează posibilități diversificate de separare selectivă.

6.2.4. Distribuția în absența schimbului ionic

În acest context, grupele funcționale active ale schimbătorului de ioni influențează repartiția interfazică constituită din soluția intergranulară și cea exterioară, introducând o discriminare netă între modul de distribuție ale speciilor electrolitice de cele neelectrolitice.

Pătrunderea electrolitului în faza de rășină, adică în rețeaua macromoleculară a acesteia se produce în mod similar cu echilibrul de sorbție într-un sistem cu membrană semipermeabilă de tip Donnan. Astfel, electroliții tari, spre deosebire de neelectroliți sunt excluși mai mult sau mai puțin din schimbătorul de ioni.

Gradul de excludere crește cu diluția soluției, cu capacitatea și gradul de reticulare al schimbătorului, crește când valența contraionului este mică, când valența co-ionului este mare și când volumul molar al electrolitului este mare.

Apariția unor interacții cu grupele funcționale active sau cu matricea afectează puternic echilibrul de distribuție fără schimb ionic. Astfel, asocierea sau formarea perechilor ionice între contraioni și gruparea fixă, localizează contraionii și reduce excluderea.

În mod similar, formarea complecşilor între contra-ioni şi co-ioni poate inhiba excluderea Donnan. În acest fel se explică reţinerea zincului în forma $[ZnCl_4]^{2-}$ pe schimbătorul anionic în forma clorură.

Speciile neionizate se distribuie între cele două faze lichide din interiorul şi exteriorul răşinii. Principalii factori care acţionează asupra acestei participări, îi constituie părţile ionizate ale polimerului schimbător de ioni.

Astfel, grupările funcţionale şi contra-ionii schimbătorului formează sfere de solvatare blocând o parte din acest solvent „liber" pentru a participa la fenomenul de distribuţie a neelectrolitului, care din acest motiv suferă fenomenul de „excludere" din răşină.

Acest efect denumit ***„salting-out"*** este cu atât mai intens cu cât răşina schimbătoare de ioni este mai reticulată şi conţine contra-ionii puternic hidrataţi (solvataţi).

Pentru a converti acest fenomen, într-un altul favorabil separării se introduce în soluţia exterioară un electrolit, care prin solvatare proprie contractează efectele de ***„salting-out"*** din răşină. Acest procedeu a dus la instituirea unei metode de separare a neelectroliţilor pe coloane cu schimbători de ioni prin ***cromatografia de „salting-out".***

În unele cazuri, se observă fenomenul invers, prin care o serie de neelectroliţi sunt puternic reţinuţi în coloana cu schimbători de ioni, fenomen care a fost denumit de ***solubilizare sau de „salting-in"***. De exemplu, alcoolii alifatici sunt solubilizaţi pe un schimbător puternic acid în forma H^+, generând un coeficient de distribuţie supraunitar, dar prezintă efectul de ***„salting-out"*** pe aceeaşi răşină dacă aceasta conţine contra-ioni de tip alcalini.

Acest efect de solubilizare poate fi micşorat prin adăugarea unui acid în soluţia externă sau a unui alt solubilizant. Procedeul acesta de separare a primit numele de ***cromatografie prin solubilizare***.

7. SEPARAREA ÎN RAPORT CU DIMENSIUNILE PARTICULELOR

O metodă de separare pe baza dimensiunilor moleculare o constituie „cernerea" sau „sitarea" moleculelor sau ionilor. O asemenea „sită moleculară" permite pătrunderea acelor particule care au dimensiuni corespunzătoare „golurilor" şi exclude pe cele cu mărimi superioare. Fenomenul acesta este cunoscut sub numele de ***„dializă"*** şi foloseşte ca „sită" o membrană semipermeabilă.

În dializă, forţa care intervine este un gradient de concentraţie, iar elementul discriminatoriu este membrana semipermeabilă. Fenomenul de difuziune este descris de prima lege a lui Fick:

$$y = -D \cdot \frac{\partial C}{\partial Z} \qquad (1)$$

unde:y-fluxul transportului de masă pe unitatea de suprafaţă, perpendicular pe direcţia Z; D-coeficientul de difuziune; $\frac{\partial C}{\partial Z}$-gradientul de concentraţie pe direcţia Z.

Înlocuind coeficientul de difuziune prin produsul între coeficientul de permeabilitate K (caracteristic fiecărei membrane) şi aria membranei, A:

$$D = K \cdot A \qquad (2)$$

şi gradientul de concentraţie prin diferenţa între două concentraţii specifice, C_o şi C_i:

$$\frac{\partial C}{\partial Z} = C_0 - C_i \qquad (3)$$

se obține după integrarea primei legi a lui Fick următoarea relație:

$$N = K \cdot A \cdot (C_0 - C_i) \cdot t \qquad (4)$$

Această relație indică proporționalitatea cantității de material difuzată, N, în funcție de aria membranei, A, de diferența de concentrație (C_0–C_i) și de timpul t, la temperatură constantă.

Ca site moleculare sau membrane semipermeabile se folosesc zeoliții naturali sau unele materiale sintetice ca alumino-silicații metal- alcaline care au dimensiunile porilor cuprinse între 3- 10 Å.

Prin investigarea comportamentului a numeroase substanțe, s-a ajuns la următoarele concluzii:

- existența unui mecanism de separare corespunzând echilibrelor de difuziune pentru moleculele mici, chiar la viteză mare de curgere;
- separarea particulelor de dimensiuni mari se realizează printr-un mecanism de excludere;
- difuzia restrictivă este cea care determină separarea particulelor având dimensiuni intermediare.

8. METODE CROMATOGRAFICE

Între metodele moderne de separare o pondere deosebit de importanţă ca aplicabilitate şi eficienţă o deţin metodele cromatografice, în special cele în fază de vapori şi de lichide la presiune înaltă.

Metoda cromatografică a fost introdusă pentru prima oară în analiza chimică de către botanistul rus Mihail Ţvet în 1903, în cadrul studiului compoziţiei unor coloranţi vegetali. Trecând aceşti produşi clorofilici printr-o coloană umplută cu $CaCO_3$ fin divizat şi supunând coloana unor perclorări repetate cu eter de petrol, s-au obţinut zone distincte, diferit colorate, corespunzătoare constituenţilor acestor produse.

Această metodă de separare, având la bază migrarea diferenţiată a componenţilor unui amestec de analizat de-a lungul unei coloane umplută cu fază staţionară adecvată sub acţiunea unei faze mobile a primit numele de cromatografie (scriere în culori).

Ulterior cromatografia s-a dezvoltat într-un ritm susţinut datorită pe de o parte dezvoltării corespunzătoare a bazei teoretice iar pe de alte parte datorită progresului electronicii. Acestea au dus la elaborarea procedeelor de înaltă performanţă în instalaţii automate de reglare, măsurare, înregistrare a semnalelor şi prelucrare a datelor.

8.1. DEFINIŢIE ŞI CARACTERISTICI

Cromatografia reuneşte o serie de metode de separare bazate pe separarea componenţilor unei probe, prin migrarea lor diferenţiată între două faze, dintre care una este staţionară, iar cealaltă mobilă.

Migrarea diferenţiată este o consecinţă a vitezelor diferite cu care componenţii amestecului antrenaţi de faza

mobilă se deplasează de-a lungul fazei staţionare în coloana cromatografică sau un echivalent al acesteia: hârtie cromatografică sau strat subţire depus pe o placă. Cu cât componenţii probei vor avea afinităţi mai diferenţiate pentru cele două faze cu care sunt puşi în contact, cu atât se vor obţine separări mai nete, datorită retenţiei lor selective.

Caracteristicile metodei cromatografice sunt următoarele:

- capacitate de rezoluţie foarte mare;
- sensibilităţi remarcabile;
- universalitatea domeniilor de aplicare;
- simple, accesibile şi rapide.

8.1.1. Clasificarea metodelor cromatografice

În mod obişnuit, metodele cromatografice sunt clasificate în primul rând după natura fazei staţionare, iar în al doilea rând după natura fazei mobile. Apar, astfel patru tipuri principale de metode urmate de alte subdiviziuni.

A) Faza staţionară solidă:

1. *Cromatografia S – L*
   - cromatografia de adsorbţie pe coloană;
   - cromatografia pe strat subţire;
   - cromatografia prin schimb ionic.
2. *Cromatografia S – G*

B) Faza staţionară lichidă:

3. *Cromatografia L – L*
   - cromatografia de repartiţie pe coloană;
   - cromatografia pe hârtie;
   - cromatografia de excludere-difuziune;
   - cromatografia pe strat subţire.
4. *Cromatografia L – G*
   - cromatografia de repartiţie pe coloană;
   - cromatografia pe coloane capilare.

8.2. PROCEDEUL ELUȚIEI

Cea mai importantă tehnică în practica analizei cromatografice este eluția. Metodologic, această metodă constă în introducerea unei cantități mici de probă în coloana cromatografică și apoi a unui volum mare de fază mobilă care se numește agent de eluare sau eluent.

Componenții separați sunt colectați la baza coloanei în fracțiuni de eluent și analizați prin metode fizice sau chimice.

Repartizarea componenților pe coloana cromatografică se numește ***developare*** iar solventul care antrenează substanța de analizat se numește ***developant.*** Rezultatul distribuției zonelor de-a lungul coloanei cromatografice se numește ***cromatogramă.***

În cazul în care proba părăsește coloana cromatografică, tehnica se numește ***eluare,*** iar solventul care antrenează componenții cromatogramei în diverse fracțiuni în ordinea în care au fost sorbiți se numește ***eluent.*** În aceste fracțiuni, fiecare component se identifică și se dozează. Reprezentarea grafică a concentrației în funcție de volumul colectat se numește ***curbă de eluție.***

8.2.1. Dinamica migrării prin procedeul eluției

Migrarea diferențiată a componenților unui amestec de analizat rezultă din aptitudinile fiecăruia dintre aceștia de a se distribui în mod diferit în coloana cromatografică, între cele două faze – staționară și mobilă. Pentru un anumit cuplu de faze, fiecare component „i" este caracterizat prin valoarea coeficientului său de distribuție (D) exprimat prin raportul concentrațiilor sale în faza staționară $(C_i)_s$ și în faza mobilă $(C_i)_m$:

$$D = \frac{(C_i)_s}{(C_i)_m} \qquad (1)$$

Distribuția diferită a componenților între faze se reprezintă grafic prin intermediul ***izotermelor de distribuție***. Forma acestora oferă indicații asupra dispersiei zonelor.

Componenții parcurg coloana cromatografică cu viteze diferite, care variază în funcție de concentrația lor în faza mobilă.

Repartiția concentrației în zonă se poate explicita prin următorul exemplu:

Considerăm două concentrații în faza mobilă C_1 și C_2 în raportul $C_2 = 2C_1$.

Valorile corespunzătoare din faza staționară absorbantă sunt desemnate prin q_1 si q_2 pentru cele trei tipuri de izoterme posibile, ca în figura alăturată.

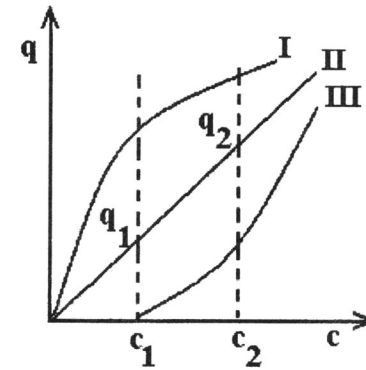


Figura 1. Izoterme de distribuție

În cazul unei sorbții liniare (I) pentru $C_2 = 2C_1$ cantitățile absorbite vor fi:$q_2 = 2q_1$, ceea ce reflectă o proporționalitate între cantitatea de substanță sorbită și concentrația sa în soluție. Aceasta are drept consecință străbaterea coloanei cromatografice cu o viteză independentă de concentrație.

În cazul unei izoterme convexe (II) se observă că $q_2 < 2q_1$. Aceasta arată că la concentrația mai mare (C_2) o mai mare proporție de substanță rămâne în soluție comparativ cu cantitatea corespunzătoare concentrației mai mici (C_1). Drept urmare componentul va parcurge coloana cromatografică cu viteză mai mare la concentrație mai mare și cu viteză mai mică la concentrație mai mică.

Pentru izoterma concavă (III), $q_2 > 2q_1$, ceea ce denotă că viteza mare va corespunde concentrației mici, deoarece la aceeași concentrație există o proporție mai mare de substanță în soluție.

În general, cel mai frecvent tip de izotermă este cel convex, iar cel mai rar tipul concav. Poziția și forma izotermelor oferă informații asupra procesului de separare. Astfel, într-un amestec, cu cât izoterma unui component se află mai apropiată de axa absciselor, acesta va fi mai puțin reținut pe faza staționară.

Distanța dintre izoterme oferă indicații relative la degajarea zonelor-izoterme apropiate însemnând posibilitatea suprapunerii zonelor componenților vecini, iar izoterme îndepărtate o separare eficace.

Mobilitatea cromatografică a unui solut, în funcție de caracteristicile sale, ale coloanei cromatografice și cele aparținând cuplului de faze – staționară și mobilă a fost evaluată prin intermediul ***ecuației diferențiale generală a cromatografiei*** stabilită de ***Wilson*** și ***Vault*** prin teoria echilibrului:

$$\left(\frac{dV}{dx}\right)_{C_M} = A_M + A_S \frac{\partial C_S}{\partial C_M} \qquad (2)$$

în care: A_M şi A_S = suprafeţele fazelor staţionară şi mobilă;
C_M şi C_S = concentraţia solutului în faza mobilă şi staţionară;
V = volumul fazei mobile scurs de la o anumită poziţie „x" de pe coloană.

Din ecuaţia generală a cromatografiei rezultă o serie de consecinţe importante de ordin practic:

- în cazul unui solut cu izotermă de distribuţie liniară, viteza de migrare este constantă şi independentă de concentraţie .În consecinţă, toate punctele zonei se vor deplasa cu aceeaşi viteză, zona conservându-şi forma sa iniţială;
- în cazul unui solut cu izotermă de distribuţie neliniară, forma zonei solutului se schimbă în timpul developării cromatografice şi anume: dacă izoterma are concavitatea în jos, punctele de concentraţii cunoscute se vor deplasa mai repede în aceeaşi zonă decât punctele de concentraţie mai mică; dacă izoterma are concavitatea în sus aceste constatări sunt inverse.

Pentru o coloană de lungime L se determină volumul de fază mobilă necesar pentru trecerea zonei infinit de fină a solutului de la partea superioară la cea inferioară a coloanei (x = L) prin volumul de retenţie (V_R) al solutului considerat:

$$V_R = V_M + D \cdot V_S \qquad (3)$$

care este o ecuaţie fundamentală în cromatografie, deoarece indică dependenţa volumului de retenţie al unui solut de coeficientul său de distribuţie (D) şi al volumelor fazelor (V_M şi V_S).

Teoria talerului teoretic

În tratarea teoretică a cromatografiei elaborată de ***Martin*** si ***Synge*** s-a făcut analogia acestui procedeu de separare cu distilarea fracționată. Pe modelul coloanelor cu talere a fost emis conceptul de ***„taler teoretic echivalent"***. Printr-un taler teoretic se înțelege o secvență din coloana care posedă o singură dată motivul microstructural, a cărei repetare permite reconstituirea întregii coloane. Fiecare coloană cromatografică se caracterizează printr-un număr de talere teoretice, notat cu N.

Din raportul lungimii coloanei L la numărul de talere teoretice, rezultă înălțimea unui taler teoretic „H" (**H.E.P.T** =**H**AUTEUR **E**QUIVALENTE D'UN **P**LATEAU **T**HEORETIQUE).

$$H = \frac{L}{N}, \text{[mm]} \qquad (4)$$

„H" este o măsură a eficacității coloanei, deoarece cu cât „H" este mai mic, cu atât numărul de echilibre de-a lungul coloanei este mai mare.

Se presupune, pentru simplificare, că există un solut unic, iar acesta se află inițial fixat la extremitatea superioară a coloanei, într-o cantitate suficient de mică pentru a fi cuprinsă în primul taler (r = 1).

În acest taler se stabilește echilibrul, compusul fiind distribuit între cele două faze conform valorii coeficientului său de distribuție, astfel încât o fracțiune R din cantitatea totală a rămas în faza mobilă şi o fracțiune 1-R a trecut în faza staționară (R fiind parametrul de retenție cromatografică). Se introduce eluentul în „n" secvențe de volume ΔV_i, conform schemei unei coloane cu talere echivalente. Faza mobilă din primul taler (r = 1) este

transferată în al doilea taler (r = 2) luând cu ea fracţiunea R din cantitatea totală Q_0 a compusului.

Fracţiunea 1-R rămâne în faza staţionară a primului taler. Echilibrul se stabileşte în fiecare din aceste talere: în primul taler cantitatea $(1\text{-}R)Q_0$, iniţial în faza fixă se distribuie astfel încât $(1\text{-}R)^2Q_0$ rămâne în această fază şi $(1\text{-}R)^2RQ_0$ trece în faza mobilă interstiţială. În al doilea taler, cantitatea RQ_0 adusă în faza mobilă se distribuie în R $(1\text{-}R)Q_0$ în faza staţionară şi R^2Q_0 în faza mobilă.

Procesul continuă în mod similar pe talerul 2, 3, etc. încât se poate scrie:

$$(1-R)^2 Q_0 + 2R(1-R)Q_0 + R^2 Q_0 = Q_0 \qquad (5)$$

unde primul termen al sumei reprezintă cantitatea pe talerul 1, cel de-al doilea termen cantitatea pe talerul 2, termenul al treilea cantitatea pe talerul 3, suma reprezentând cantitatea iniţială.

Generalizând, după „n" transferuri succesive, se poate observa că termenii succesivi ai acestei sume reprezintă dezvoltarea binomului: $[(1-R)+R]^n$ şi, dacă notăm cu Q_{r+1} cantitatea de substanţă eluată care se găseşte pe talerul de ordinul r + 1 rezultă:

$$Q_{r+1} = \frac{n!}{r!(n-r)!} R^r (1-R)^{n-r} \qquad (6)$$

sau, ţinând cont de valoarea lui R în funcţie de factorul de capacitate $K'(K' = \beta), \beta = \frac{V_S}{V_M}; R = \frac{1}{1+K'}$,

rezultă:

$$Q_{r+1} = \frac{n!}{r!(n-r)!} \frac{K^{'}(n-r)}{\left(1+K^{'}\right)^{n}} \tag{7}$$

Aceasta este legea de distribuţie a substanţei eluate în coloană, când elementul a progresat cu r talere, respectiv la distanţa $L = rH$ în funcţie de distanţa măsurată în lungul coloanei începând din primul taler.

Dacă avem de-a face cu o trecere continuă a fazei mobile prin coloană, atunci distribuţia componentului prin coloană urmează distribuţia binomială limită, pentru $n \to \infty$, adică distribuţia ***POISSON*** şi relaţia de mai sus devine:

$$Q_{r+1} = \frac{1}{r!} R^{r} \exp.(-R) \tag{8}$$

Relaţia permite calcularea conţinutului total de solut aflat pe un taler oarecare în funcţie de ordinul talerului şi de parametrul de retenţie cromatografică Q.

Dispersia zonelor cromatografice

În timpul migrării prin coloană, corpul eluat nu rămâne concentrat într-o porţiune tot atât de îngustă ca în zona de start. Se produce, dimpotrivă, o etalare progresivă a zonei pe măsură ce ea avansează în coloană. Moleculele (sau ionii) suferă o dispersie în jurul unei poziţii medii unde se găseşte maximum de concentraţie.

Admiţând că această dispersie ascultă de legile de distribuţie întâmplătoare, curba de distribuţie în coloană a speciei eluate, sau curba de eluţie, are forma unei curbe Gauss, simetrică în raport cu poziţia medie. Cauzele care duc la lărgirea zonelor cromatografice sunt următoarele:

1.-echilibrul de distribuţie al solutului între faze nu se atinge în mod instantaneu în toate punctele coloanei;

2.-zona solutului suferă o dispersie ca urmare a difuziei în faza mobilă şi în faza staţionară;

3.-curgerea fazei mobile se face întâmplător;

4.-la faza staționară solidă se asociază părți importante din faza mobilă.

Rezoluție și optimizare

Dispersia zonei nu este suficientă pentru a evalua ó separare, deoarece H.E.P.T. este mai degrabă o măsură a puterii de separare a coloanei. Problema separabilității pentru o pereche dată de componenți este formulată printr-o expresie care măsoară gradul total de separare prin intermediul funcției numită ***rezoluție,*** notată cu R_S și definită prin:

$$R_S = \frac{2\Delta Z}{l_1 + l_2} \tag{9}$$

unde: ΔZ = distanța între maximum de concentrație a picurilor de eluție aparținând celor doi soluți vecini 1 si 2;
l = lățimea fiecărui pic.

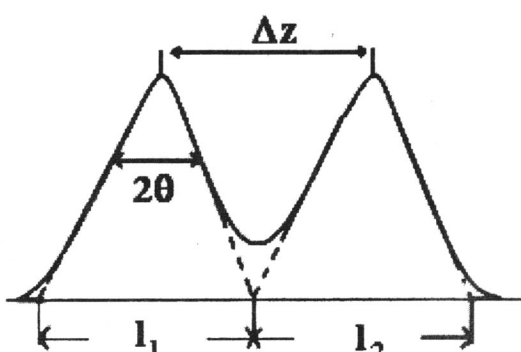


Figura 2. Picuri cromatografice pentru definirea rezoluției

Prin urmare, valoarea numerică a rezoluției pentru două picuri ale căror tangente se ating este:

$$R_S = \frac{2 \cdot (4\theta)}{8\theta} = 1{,}0 \qquad (10)$$

Valori mai mici decât 1,0 reprezintă separări mai slabe iar valori mai mari decât 1,5 nu sunt necesare.

Rezoluția depinde de diferiți parametri ai coloanei. Este posibil să se găsească valori ale acestor parametri care să conducă la rezoluții maxime. Acest procedeu se numește optimizarea condițiilor experimentale în raport cu rezoluția.

8.2.2. Tehnici de eluție

Cea mai simplă separare cromatografică se operează prin eluție izocratică, respectiv fără modificarea condițiilor de lucru. Această tehnică de eluție este posibilă în cazul unui amestec cu număr redus de componenți.

În funcție de valorile coeficienților de distribuție se realizează ***eluția selectivă*** sau ***simultană***. Eluția selectivă se aplică probei în care componenții prezintă diferențe mari ale valorilor coeficienților de distribuție. Cu cât aceste diferențe sunt mai mari cu atât sunt necesare coloane mai mici dar mai eficace (H.E.P.T. cât mai mici).

În cazul în care proba conține mai mulți componenți, eluția izocratică devine necorespunzătoare și se folosește așa numita ***„eluție în etape"***. În acest caz se adaugă eluenți diferiți, în mod discontinuu, cu o putere de eluție crescătoare.

Această tehnică este recomandată numai în cazul probelor cu izoterme liniare şi de compoziţie cunoscută, pentru a decide uşor când trebuie schimbat eluentul. Dezavantajul acestei tehnici constă însă în apariţia unor picuri auxiliare.

Din acest motiv s-a dezvoltat tehnica ***„eluţiei cu gradient"***. În acest caz puterea de eluţie a solventului care intră în coloană se schimbă în mod continuu crescător.

Gradientul de eluţie se realizează de obicei cu doi solvenţi: unul slab şi celălalt puternic. Aceştia sunt amestecaţi în proporţii treptate astfel încât primul care părăseşte dispozitivul să fie cel slab.

Pentru a mări eficacitatea separărilor în cazul amestecurilor multicomponente s-a recurs şi la alte procedee de eluţie:

- ***eluţia cu debit programat, care constă în modificarea debitului fazei mobile în timpul separării;***
- ***eluţia cu temperatură programată*** ;
- ***eluţia cu gradient de fază staţionară sau cu coloane cuplate umplute cu faze staţionare cu polarităţi diferite.***

9. CROMATOGRAFIA DE LICHIDE PE COLOANĂ

9.1. APARATURĂ

Dezvoltarea cromatografiei de lichide sub presiune s-a datorat rapidității și rezoluțiilor superioare pe care le oferă. Pentru a alege viteza optimă a fazei mobile se reprezintă grafic variația înălțimii talerului teoretic (H) în funcție de viteza fazei mobile.

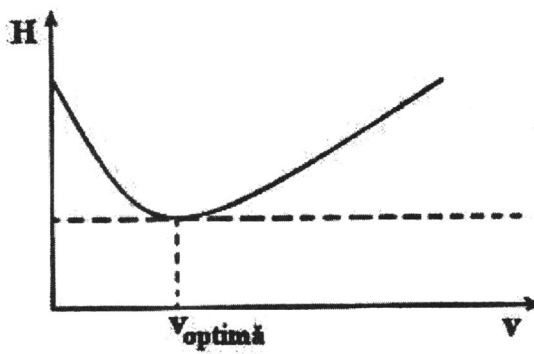


Figura 1. Dependența înălțimii talerului teoretic de viteza fazei mobile

Practic se folosesc coloane umplute cu o pulbere foarte fină de particule sferice cu care se operează la presiune înaltă. Instalația necesară este prezentată în schema alăturată.

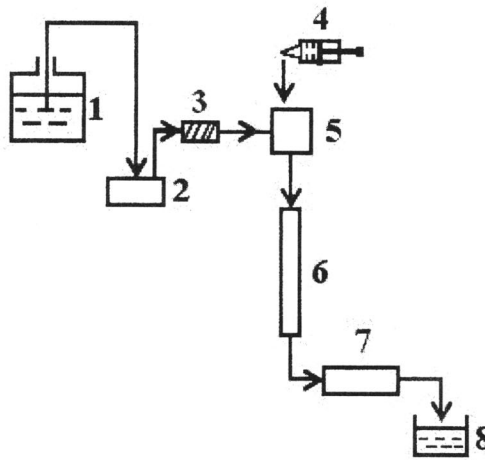


Figura 2. Schema unui cromatograf de lichide:
1.- rezervor cu fază mobilă;
2.- pompă de reglare a debitului ;
3.- precoloană;
4,5.- dispozitive pentru introducere şi recepţionare a probei;
6.- coloană cromatografică;
7.- detector prevăzut cu înregistrator şi calculator;
8.- colector de fracţiuni.

În aparatul cromatografic, ansamblul componentelor amplasate în faţa dispozitivului de injectare al probei, constituie sistemul de alimentare cu fază mobilă.

El include următoarele părţi:

- rezervorul cu faza mobilă;
- dispozitiv de degazare a fazei mobile;
- dispozitiv de omogenizare a fazei mobile.

Se poate obține un gradient exponențial de eluție prin introducerea unui solvent puternic polar într-un vas care conține solventul inițial slab polar; se omogenizează și apoi se alimentează pompa. Aceasta este o pompă special fabricată, care să nu genereze pulsații deoarece cei mai mulți detectori sunt sensibili la variațiile de flux ale fazei mobile. De asemenea, pompele trebuie să fie compatibile cu solvenții utilizați, să poată alimenta continuu coloana cu eluent și să permită o programare. În acest scop se folosesc pompele cu piston tip seringă și pompele aspiratoare-respingătoare cu piston sau diafragmă.

Coloanele cromatografice sunt confecționate din metale (Al, Cu), oțel inoxidabil, materiale plastice sau sticlă. Au diametrul 0,2-1,0 cm iar L = 20-100 cm. Se pot folosi mai multe coloane legate în serie pentru a se realiza o separare eficientă. Coloanele sunt prevăzute la partea superioară cu un rezervor pentru faza mobilă iar la partea inferioară cu un opritor format din sticlă perforată, frită sau vată de sticlă. Coloanele folosite trebuie să reziste la presiuni înalte, ceea ce impune etanșeizări la capete prin racorduri corespunzătoare.

În cazul cromatografiei la presiune înaltă se utilizează seringile micrometrice tip ***Hamilton***.

Detectoarele sunt instrumente care indică calitativ și cantitativ prezența componenților separați, la ieșirea lor din coloana cromatografică, în efluent. Prin măsurarea unei proprietăți care depinde de concentrație, detectorul emite semnale care sunt înregistrate pe cromatograme.

Un detector ideal, trebuie să fie foarte sensibil (10^{-12}-10^{-11} g/cm^3), să dea un răspuns liniar în functie de concentrație pe un interval cât mai larg, să prezinte o viteză de răspuns mare, să opereze în mod continuu și să nu fie influențat de modificarea compoziției fazei mobile. Toate aceste condiții nu pot fi însă îndeplinite și din acest motiv se

recomandă utilizarea simultana a mai multor detectoare de tipuri diferite. Se folosesc în acest sens:

- detectoare refractometrice;
- detectoare fotometrice;
- detectoare cu transport de solut;
- detectoare conductometrice, etc.

Funcționarea lor se bazează pe măsurarea unei proprietăți a lichidului eluat sau pe măsurarea unei proprietăți fizice caracteristice componentului separat.

9.2. CROMATOGRAFIA DE ADSORBȚIE

Cromatografia de adsorbție în faza lichidă este o metodă de separare bazată pe migrarea diferențiată a componenților amestecului de analizat într-o coloană conținând o fază staționară solidă cu proprietăți adsorbante. Metoda se numește cromatografie solid-lichid (C.S.L.) și are aplicații în special în domeniul substanțelor neionice cu mase moleculare medii.

Drept adsorbanți se folosesc alumina și silicagelul. Activarea lor se realizează prin încălzire, pentru a produce deshidratarea. Reproductibilitatea rezultatelor în funcție de activitatea adsorbanților se face prin testare. Astfel, testarea aluminei se efectuează prin măsurarea adsorbabilităților relative a unor azocoloranți la eluarea cu o serie de solvenți precizați. Procedee similare se aplică și pentru silicagel.

În cromatografia de lichide de înaltă rezoluție, umplutura trebuie să fie stabilă, să nu se umfle sau să se contracte și să nu ofere drumuri lungi de difuzie. Pentru operare la presiune ridicată se recomandă particule cu dimensiuni mici (Φ = 5-10 μm) rezistente la presiune. Acestea sunt materiale cu porozitate superficială sau peliculare, comercializate sub diferite denumiri (Porasil, Davison, Vidac, Pelicarb, etc).

9.3. CROMATOGRAFIA DE REPARTIȚIE

Cromatografia de repartiție în fază lichidă se bazează pe distribuția componenților amestecului de analizat într-o fază staționară lichidă și o fază mobilă tot lichidă. Din această cauză procedeul se numește cromatografie lichid-lichid (C.L.L.). Faza staționară lichidă nemiscibilă cu faza mobilă ocupă un suport solid fin divizat și inert. Metoda se aplică cu precădere în analiza urmelor, deoarece se poate adapta ușor la analize cantitative de înaltă precizie.

Se folosesc în aceasta tehnică două tipuri de suporturi: poroase și superficial poroase. Ultimele dau umpluturi reproductibile și omogene, precum și o înaltă eficiență obținută la viteze ridicate. Dimensiunile granulelor care asigură eficiența separărilor au diametrul cuprins între 5-20 μm.

Acoperirea suportului cu faza staționară lichidă se efectuează prin două procedee:

- se prepară o suspensie constituită din suport, cu 0,5-10 % soluție de lichid staționar într-un solvent volatil care apoi se evaporă;
- prin adăugarea direct în coloană a unor cantități mici de lichid staționar în solventul mobil saturat cu primul

În cromatografia de repartiție, ambele faze – staționară și mobilă – sunt lichide.

Lichidul staționar este ales cu o polaritate asemănătoare cu a probei și cum faza mobilă trebuie să fie nemiscibilă cu cea staționară, aceasta din urmă va avea în consecință o polaritate diferită.

Când separarea impune ca faza staționară să fie nepolară și faza mobilă polară, procesul se numește cu ***„faze inversate"***.

În cromatografia cu faze inversate, care a luat o amploare deosebită în etapa actuală, se folosesc hidrocarburile liniare C_8 sau C_{18}, legate covalent pe suprafaţa particulelor de silice. Ca eluenţi se folosesc amestecurile apoase de solvenţi.

Deoarece natura solventului domină retenţia pe faza staţionară, este de aşteptat ca diferiţi solvenţi să se manifeste în mod diferit, astfel încât se poate optimiza rezoluţia şi de asemenea se poate controla separarea.

În cazul unor amestecuri foarte complexe se aplică procedeul variaţiei compoziţiei solvenţilor. În mod practic, se utilizează mai multe rezervoare conţinând de exemplu: apă pură, metanol şi acetonitril şi se introduc în coloană diferite amestecuri în proporţii variabile. Uneori se acţionează prin modificarea pH-ului elementului şi, mai rar, prin ridicarea temperaturii.

9.4. CROMATOGRAFIA PRIN SCHIMB IONIC

În cromatografia prin schimb ionic (C.S.I.) se utilizează o fază staţionară schimbătoare de ioni şi o fază mobilă lichidă salină, incluzând substanţele ionizabile supuse procesului de analiză.

Schimbătorii de ioni sunt materiale, uzual de tip polimeric, insolubile în cei mai mulţi solvenţi, având grefate grupe funcţionale ionizabile pe reţeaua tridimensională. Acestea îi conferă proprietăţile de schimbător de ioni, deoarece sarcina lor electrostatică este neutralizată de ioni mobili care pot fi înlocuiţi cu ioni având sarcină similară, din soluţia înconjurătoare.

Se folosesc în mod curent răşini sintetice constituite într-o matrice formată dintr-un polimer înalt, care este, de obicei, polistirenul sau acidul polimetacrilic. Primul tip este obţinut din polimerizarea stirenului în prezenţa unei mici

cantități de divinilbenzen. Procentul de D.V.B. determină gradul de reticulare al rășinii care este un factor important în cromatografie. Pentru utilizarea lor în cromatografia de lichide la presiune înaltă este necesar un grad de reticulare sub 4 %. Recent, în numeroase lucrări sunt utilizați:

- ***schimbători de ioni anorganici***: săruri heteropoliacide, săruri de Zr, fosfați de Sn (IV) etc;
- ***schimbători de ioni lichizi***: tri-n-octilamina (TNOA), acidul 2-etil-hexilfosforic (HDEHP);
- ***schimbători de ioni chelatizanți*** care conțin grupări funcționale chelatizante;
- ***schimbători de ioni din celuloză și dextran*** (polizaharid) comercializați sub diverse denumiri: Sephadex, Sepharose, Sephacel.
- ***schimbători de ioni superficial poroși și peliculari*** –folosiți recent în cromatografia de lichide la presiune înaltă. Sunt constituiți din granule cu miez solid inert și cu suprafețele poroase acoperite cu un film subțire de schimbător de ioni reținut mecanic sau chimic. Sunt comercializați sub diferite denumiri ca: Zipax, Vydac, etc.

Solvenții folosiți ca faze mobile pot modifica selectivitatea. Astfel, cantități mici de solvenți organici ca etanolul, tetrahidrofuranul, acetonitrilul adăugați sistemului apos (faza mobilă) duc la creșterea solubilității probei ceea ce conduce implicit la variația retenției.

9.5. CROMATOGRAFIA PERECHILOR IONICE

Reprezintă o formă particulară a cromatografiei de lichide bazată pe mecanismul de repartiție asociat cu cel de schimb ionic. În principiu, separarea are loc în urma cuplării speciilor ionice sau ionizabile ale amestecului de analizat cu ioni organici de dimensiuni mari (contraioni) cu care

formează perechi ionice. Alegerea judicioasă a tipului şi a concentraţiei contra-ionilor permite separări dificile, mai ales dacă se operează cu sistemul cu faze inversate.

Procedeul se caracterizează prin selectivitate înaltă şi capacitate mare. Se aplică cu precădere în domeniul biochimic, farmacologic şi cel al poluanţilor.

Se disting două categorii de contraioni:

- ***anionici*** (agenţi formatori de perechi ionice cu probe bazice: acidul percloric, acidul dodecil-sulfonic, acidul naftalensulfonic, etc);
- ***cationici*** (clorura de tetrametilamoniu, iodura de tetraetilamoniu, etc). Pentru formarea perechilor ionice sunt preferaţi ionii de amoniu cuaternar, deoarece se pot folosi la orice valoare de pH. Suporturile folosite în această tehnică trebuie să prezinte forma poroasă şi inertă. În lucrările de cromatografie ale perechilor ionice se folosesc ca umpluturi pentru coloane particule poroase cu Φ = 3-5 μm din celuloză comercializaţi sub diverse denumiri: Porasil, Celită, Bonndapak, etc. Sensibilitatea metodei (cantitatea minimă decelabilă) depinde de absorbabilitatea molară a probei care migrează şi de zgomotul detectorului (se folosesc detectori fotometrici). Eficienţa coloanelor cromatografice în sistemul perechilor ionice este foarte bună. Astfel, pentru un debit de fază mobilă de 4 mm/s, înaltimea unui taler teoretic $H < 0,1$ mm. Factorii de selectivitate se încadrează în intervalul 3-4, în ciuda faptului că probele au constante de extracţie aproximativ egale.

9.6. CROMATOGRAFIA DE EXCLUDERE-DIFUZIE

Este o formă a cromatografiei de lichide bazată pe separarea componenţilor din proba de analizat în raport cu masa lor moleculară. Separarea prin materiale cu porozitate bine definită constă din excluderea moleculelor mari, care depăşesc dimensiunea porilor şi accesibilitatea totală sau parţială în pori a moleculelor mai mici. Fluxul de fază mobilă antrenează moleculele mari, pe când cele mici, care pot penetra în matricea umpluturii, vor fi întârziate. Urmează eluarea din coloană, în ordinea descrescătoare a dimensiunilor, respectiv a maselor lor moleculare. Practica a demonstrat existenţa unei relaţii signoidale între valorile coeficienţilor de distribuţie (D) pentru o serie de compuşi şi valorile logaritmice ale maselor lor moleculare. Curbele de calibrare construite pe această cale, pentru un anumit gel, reprezintă curbele de selectivitate. Acestea reliefează intervalul de dependenţă liniară între D şi M.

Fazele staţionare în cromatografia de excludere-difuzie sunt solide, poroase, perfect controlabile şi reproductibile. În acest scop se folosesc două tipuri de geluri: ***xerogeluri*** şi ***aerogeluri***. Primele sunt geluri în sens clasic, adică polimeri reticulaţi care în contact cu solventul se umflă formând un mediu poros relativ moale. Prin îndepărtarea lichidului structura gelului revine la forma iniţială. Aerogelurile sunt materiale rigide, care nu sunt geluri propriu-zise; sunt solide poroase, care permit pătrunderea solventului, dar nu îşi schimbă forma. Cele mai importante geluri utilizate în cromatografie sunt cele dextranice reticulate cu epiclorhidrină (Sephadexul şi Sephacrylul).

Lichidul care funcţionează ca fază mobilă se alege în funcţie de proprietăţile sale fizice: vâscozitate, indice de refracţie (când se folosesc detectori refractometrici sau

fotometrici), de proprietăţile de solubilizare ale probei supuse analizei şi de efectele de umflare asupra materialelor poroase. Cei mai folosiţi solvenţi sunt: H_2O, $CHCl_3$ şi tetrahidrofuranul.

9.7. CROMATOGRAFIA DE AFINITATE

Acest procedeu constă în ataşarea pe suportul insolubil din coloană a unor grupări care funcţionează ca liganzi specifici pentru anumite molecule de solut pe care le leagă prin covalenţă. Aceste molecule cuplate prin intermediul ligandului sunt întârziate în deplasarea lor prin coloană, spre deosebire de alte molecule coprezente care sunt antrenate fără oprire fiind primele evacuate din coloană.

Metoda se aplică cu succes la purificări, izolări de compuşi care se găsesc la nivelul microcantităţilor în amestec cu cantităţi mari de alte substanţe de contaminare. Succesul unor asemenea separări este condiţionat de o alegere corectă a ligandului; el trebuie să se lege în mod specific şi reversibil numai de un anumit tip de molecule care să poată fi apoi desorbite, lăsând coloana cromatografică în starea să activă iniţială. Dintre suporţii solizi utilizaţi frecvent în cromatografia de afinitate sunt: derivaţi celulozici, hidrofilici, geluri polistirenice, dextrani reticulaţi, geluri poliacrilamidice, sticle poroase şi mai recent gelul provenit din agaroză şi denumit Sepharose.

9.8. APLICAŢII ALE CROMATOGRAFIEI DE LICHIDE PE COLOANĂ

- separarea unor amestecuri sintetice prin mecanismul de adsorbţie pe particule mici de silicagel (~75 Å) folosind ca fază mobilă diclormetan semisaturat cu apă;

- separarea unor pesticide formate din derivaţi fosforici şi halogenaţi;
- separări de medicamente (anticonvulsanţi şi compuşi diazepamici);
- separări de amestecuri de aminoacizi prin cromatografia de schimb ionic;
- separarea unor oligozaharide, etc.

În general, cromatografia de lichide pe coloană are numeroase şi variate posibilităţi de aplicaţie. Am redat mai înainte câteva din cele mai recent obţinute. Iată acum, cum arată o astfel de cromatogramă:

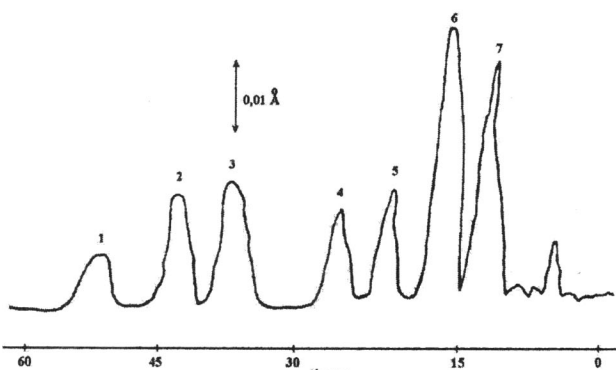


Figura 3. Separarea unui amestec sintetic standard pe silicagel (dimensiunea particulelor 8-9 μm):

1. fenil-propanol;
2. fenil-metanol;
3. fenil-dimetil-metanol;
4. difenil-metanol;
5,6 impurităţi;
7. xilenol.

10. CROMATOGRAFIA DE GAZE

Separările prin cromatografia de gaze au la bază distribuția componenților între o fază staționară solidă sau lichidă și o fază mobilă gazoasă.

Când faza staționară este solidă are loc un mecanism de adsorbție, iar când faza staționară este un lichid nevolatil care acoperă un suport inert poros, distribuția se realizează printr-un mecanism de repartiție.

Metoda s-a impus prin avantajele pe care le prezintă: eficiență, selectivitate și rapiditate. Aceste avantaje provin, în principal, din proprietățile gazelor și anume, datorită vâscozității lor mici care oferă viteze mari la stabilirea echilibrului de distribuție.

Având vâscozitate mică, se pot folosi coloane lungi ceea ce conduce la creșterea eficacității procedeului, iar atingerea rapidă a echilibrului de distribuție interfazică presupune rezistență mică la transferul de masă, ceea ce face posibilă viteza mare de flux.

În plus, componenții separați, purtați de efluentul gaz purtător, sunt determinați foarte ușor prin urmărirea variației compoziției acestuia cu mijloace simple, continue și automate.

10.1. APARATURA

Schema generală a unui cromatograf de gaze este redată astfel:

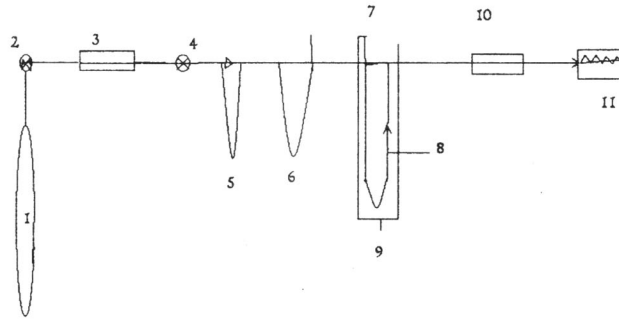


Figura 1. Schema bloc a unui cromatograf de gaze:

1. butelie cu gaz purtător;
2. reductor de presiune;
3. uscător-purificator;
4. control fin;
5. debitmetru;
6. manometru;
7. dispozitiv pentru introducerea probei;
8. coloană cromatografică;
9. termostat;
10. detector;
11. înregistrator.

Gazul purtător inert, provenit din butelie, trece prin dispozitivele de reglare şi măsurare a presiunii, apoi antrenând proba intră în coloană unde are loc procesul de separare.

Componenţii separaţi părăsesc coloana însoţiţi de gazul purtător în detector, care emite semnale ce se transmit înregistratorului.

De remarcat că, componenţii probei se pot recupera prin simpla condensare în anumite trepte de răcire, dacă aceştia trebuie să fie supuşi unor investigări suplimentare.

10.1.1. Ansamblul de alimentare cu gazul purtător

În cromatografia de gaze sunt folosite frecvent: H_2, N_2, Ar, He şi CO_2. Dacă componenţii probei sunt sensibili faţă de H_2O sau O_2 aceştia se îndepărtează prin trecerea gazului printr-o coloană de uscare înainte de a intra în coloana de separare. Coloana de uscare este umplută cu diferite substanţe higroscopice cum sunt: silicagel, perclorat de Mg, site moleculare etc.

Îndepărtarea oxigenului din gazul purtător se realizează prin trecerea gazului prin filtre speciale (oxisorb) sau printr-un tub care conţine oxid de mangan.

Debitul de gaz se menţine constant (erori admise ± 0,2 %) cu ajutorul unor robinete reductoare de presiune uzual cu membrană sau cu mercur.

Debitul de gaz se controlează cu un manometru diferenţial montat la capetele coloanei, sau cu un debitmetru cu bulă de săpun, montat la ieşirea din aparat.

Debitul se măsoară înainte şi după efectuarea analizei, pentru a opera eventualele corecţii în răspunsul detectoarelor sensibile la fluctuaţiile de debit.

Natura gazului purtător are influenţă asupra performanţelor coloanei: eficienţă şi rapiditate.

Pentru alegerea corectă a gazului purtător se întocmesc diagrame care urmăresc variaţia înălţimii talerului teoretic (H) în funcţie de viteza medie liniară a gazului purtător ($\overline{V}$), ca în figura de mai jos:

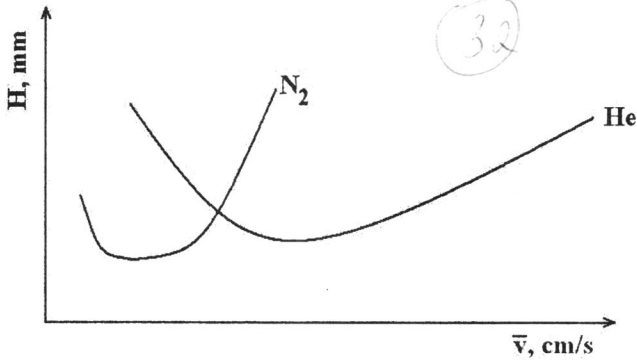


Figura 2. Dependența înălțimii talerului teoretic de viteza medie liniară a gazului purtător (curbe Van Deemter)

Se poate observa că N_2 oferă o valoare H mai mică decât He, motiv pentru care, pentru rapiditate, se preferă azotul.

10.1.2. Dispozitivul pentru introducerea probei. Coloane de separare

Atât cantitatea cât şi modul de introducere a probei în coloana de separare constituie unul dintre factorii care afectează eficacitatea separării. Teoretic, ar trebui introdusă o cantitate de probă în stare de vapori în mod instantaneu şi numai atât cât să corespundă unui taler teoretic din coloana utilizată pentru separare. Aceasta este însă practic imposibil.

Metoda de introducere a probei depinde de starea în care se găseşte (L, G, S). Metoda universală de introducere a lichidelor în coloană foloseşte seringi Hamilton de capacităţi diferite 1-50 μL.

Proba lichidă introdusă trebuie să fie transformată în stare de vapori. De aceea, în practică s-a introdus o cameră de vaporizare încălzită independent de temperatura coloanei, în care proba este adusă în stare de vapori şi apoi este antrenată de curentul de gaz purtător în coloană.

Un alt sistem de introducere a unor cantităţi mici de lichide constă în înfiolarea probei într-o capilară, care apoi se sparge în curentul de gaz purtător cu ajutorul unui dispozitiv special.

Substanţele solide sunt introduse cu seringa în aparatul de cromatografiere, după dizolvare într-un solvent convenabil sau în stare topită.

Coloanele cromatografice sunt confecţionate din tuburi de metal (oţel inoxidabil, alamă, Al, Cu) sticlă sau material plastic (PVC, nylon). Φ este variabil 0,1-8 mm iar L = 2-4 m (în unele cazuri L = 15-20 m). După umplere coloanele se pot îndoi în forme diferite. Recent, s-au produs coloane capilare ai căror pereţi interiori sunt acoperiţi cu un suport solid, de obicei Celite. Alegerea temperaturii de lucru a coloanei se face în funcţie de temperatura limită de stabilitate a fazei staţionare şi trebuie menţinută în intervalul $\pm 0,5 - \pm 1^0$ C.

10.1.3. Detectoarele

Din punct de vedere constructiv, detectorul constituie partea esenţială a instalaţiei de cromatografiere, care determină sensibilitatea şi precizia metodei. O sensibilitate mare permite utilizarea unor cantităţi mici de probă şi, ca urmare, sporeşte eficacitatea coloanelor de separare.

Detectoarele universale semnalează prezenţa tuturor componenţilor din probă, iar detectoarele numite „specifice" sunt instrumente cu răspuns selectiv şi specific pentru anumite clase particulare de substanţe.

Un asemenea detector este cel cu captură de electroni, care furnizează un răspuns preferențial pentru compușii care conțin atomi cu afinitate mare pentru electroni (O_2, H_2, X_2).

Fiind extrem de sensibile, aceste detectoare se folosesc în analiza microurmelor de reziduuri, pesticide, etc. În mod frecvent în cromatografie sunt utilizate următoarele detectoare:

- detectorul de conductibilitate termică (catarometru);
- detectoare de ionizare:
  1) în flacără;
  2) în argon;
  3) cu captură de electroni;
  4) detectorul de microunde cu plasmă;
  5) detectorul flamfotometric.

Tipurile de detectoare împreună cu toate caracteristicile lor se găsesc tabelate în tratatele de specialitate ușurând astfel alegerea lor în funcție de scopul propus.

10.1.4. Reglarea temperaturii

Într-un sistem cromatografic cu performanțe ridicate se lucrează la o temperatură riguros constantă. În coloana cromatografică, temperatura asigură menținerea în stare de vapori a tuturor componenților.

Practic, se lucrează fie izoterm, fie cu un anumit gradient mobil de temperatură (termocromatografia) sau în regim programat. Ultimul se aplică pentru separarea componenților cu puncte de fierbere foarte apropiate.

O temperatură redusă duce la creșterea puterii de separare dar compromite compactitatea zonelor cromatografice care apar dispersate, scăzând precizia rezultatelor.

O temperatură prea mare riscă volatilizarea fazelor staționare lichide și scade sensibilitatea detectoarelor. De asemenea, inconstanța temperaturii duce la modificarea liniei de bază a cromatogramei inducând erori la determinarea concentrației componenților analizați.

Temperatura afectează în plus vâscozitatea fazei staționare dar și a gazului purtător, prin urmare influențează diferența de presiune în coloană și în consecință debitul. Pentru anularea acestor efecte sunt necesari regulatori de presiune cu rolul menținerii debitelor constante în coloană.

Temperatura în coloană se poate stabili pe un interval destul de larg: de la -180 ^{0}C până la 400 ^{0}C. În principiu, se alege acea temperatură pe care o permite faza staționară, pentru a realiza într-un timp scurt o rezoluție cât mai bună a tuturor componenților.

Recent, au fost construite cromatografe cu care se poate executa o analiză chimică completă în mod automat. Toate operațiile necesare sunt realizate în cursul unui ciclu de analiză, care lucrează câteva minute. Acestea sunt cromatografe de proces.

Comenzile necesare analizei automate sunt date de către unitatea de programare, care dictează secvențial diferite funcții la anumite intervale de timp stabilite în faza de etalonare a aparatului. După terminarea unui ciclu de analiză, programatorul reia în mod automat toate comenzile.

10.2. MATERIALE CROMATOGRAFICE

10.2.1. Faze staționare lichide

În calitate de lichide de repartiție se utilizează o gamă largă de substanțe chimice. Pentru alegerea celui optim trebuie să se țină cont de următoarele condiții:

- lichidul utilizat să aibă o selectivitate înaintată, care depinde de forţele de interacţiune dintre componenţii probei şi lichidul de repartiţie;
- să prezinte o rezistenţă termică ridicată;
- să aibă o bună capacitate de solubilizare pentru componenţii probei;
- să aibă o vâscozitate redusă, pentru a permite difuzia fazei mobile;
- să fie accesibile şi să funcţioneze în mod reproductibil.

Ca regulă generală s-a constatat că separările eficace se obţin numai când structura fazei lichide este asemănătoare pe cât posibil cu aceea a probei. În caz contrar, trebuie să se lucreze cu faze cu polarităţi diferite.

În ultimul timp se folosesc ca faze staţionare lichide chimic legate pe suport cum sunt: Durapak şi Permaphase livrate de firmele Waters şi Du-Pont.

10.2.2. Suportul

Rolul suporţilor solizi în cromatografia de gaze constă în a reţine lichidul staţionar în coloană. Un suport solid ideal trebuie să fie inert, să aibă o suprafaţa mare şi o porozitate uniformă. În acest scop se foloseşte: kiselgurul livrat sub diferite denumiri comerciale ca: chromosorb P; W; G; A; polimerii fluoruraţi (Fluropak-80; Teflon T_6) sau perlele de sticlă.

10.2.3. Faze staţionare solide active

În cromatografia de adsorbţie, umplutura coloanei este constituită dintr-un solid cu proprietăţi adsorbante. Datorită unor avantaje pe care le prezintă (stabilitatea mare a

coloanei cu adsorbant, separarea substanţelor volatile) se aplică cu succes la separarea substanţelor în urme.

Caracteristicile principale ale adsorbanţilor utilizaţi în cromatografia de gaze sunt următoarele:

- cărbunele activ, prezintă o suprafaţă mare;
- alumina fiind puternic polară, are activitate catalitică. Din aceste motive se modifică chimic suprafaţa aluminei prin: calcinare, tratare cu NaOH, Br^-, I^-, CuCl, $AgNO_3$ sau CdI_2;
- silicagelul este asemănător aluminei, dar se prepară mai uşor. Se comercializează sub denumirile de Durapak, Permaphase;
- sitele moleculare – de tip zeolitic (silicaţi de Al) conţin pori de mărimi şi forme foarte regulate;
- polimerii microporoşi obţinuţi prin copolimerizarea stirenului cu divinilbenzen comercializaţi sub denumirea de PorApak au dimensiunea porilor dependentă de proporţia de D.V.B.

10.3. ANALIZA CALITATIVĂ

După separarea prin cromatografia de gaze, componenţii pot fi identificaţi, dozaţi şi recuperaţi prin condensare. Determinarea se efectuează, în primul rând, pe baza parametrilor de retenţie măsuraţi pe cromatogramă. Se pot însă identifica componenţii în efluentul rezultat din coloana cromatografica prin următoarele teste clasice:

- barbotarea efluentului în soluţii ce conţin reactivi sensibili;
- măsurări de M, p_f sau p_t;
- analiza instrumentală: metode spectroscopice sau rezonanţĂ magnetică nucleară.

10.4. ANALIZA CANTITATIVĂ

În analiza cantitativă se impun însă următoarele condiţii:

- introducerea exactă a probei;
- condiţii de operare constantă;
- precizia măsurării suprafeţei picurilor;
- asigurarea coeficientului de sensibilitate al fiecărui constituent;
- liniaritatea răspunsului dat de detector;
- coloane care să ofere rezoluţii corespunzătoare

10.4.1. Determinarea prin intermediul cromatogramei

Detectorii integrali permit măsurarea directă a volumului de titrare, a volumului de gaz sau a masei materialului. Când se folosesc detectorii diferenţiali măsurarea cantitativă se bazează pe relaţia între cantitatea de compus introdus în cromatograf şi fiecare suprafaţă sau înălţime a picului corespunzător din cromatogramă.

Când picurile sunt simetrice se poate măsura suprafaţa din produsul între înălţimea şi semilăţimea picului. Dacă picurile sunt largi se recomandă măsurarea suprafeţei din produsul între înălţimea şi lăţimea picului corespunzătoare la semiînălţime (vezi figura alăturată).

Suprafaţa picurilor nesimetrice se măsoară planimetric sau cu un integrator cu înregistrator.

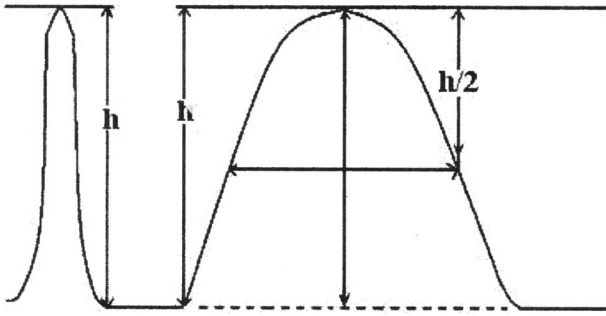


Figura 3. Picuri simetrice

Dacă condiţiile experimentale nu pot fi reproduse în mod exact, se folosesc substanţe de referinţă ca etaloane. În acest caz se aplică următoarele metode:

- metoda „standardului intern" care constă din introducerea în probă a unui standard de concentraţie cunoscută şi compararea picurilor cromatografice;
- metoda „normării interne" sau a „normării ariilor". În acest caz concentraţia procentuală a unui component „i" este dată de relaţia:

$$C_i = \frac{A_i}{\sum_{j=i}^{n} A_j}$$

unde:

$A_1, A_2, \ldots, A_n$ sunt ariile picurilor individuale;

- metoda calibrării directe constă din compararea picului de concentraţie necunoscută cu cel obţinut pentru acelaşi component, dar de concentraţie cunoscută

10.4.2. Prelucrarea automată a datelor cromatografice

În cazul cromatogramelor, semnalul electric obținut de la detector poate fi afișat în mod corespunzător prin intermediul unor dispozitive electrice și electronice. Prelucrarea cromatogramei se poate face analogic sau numeric.

În primul caz dispozitivele utilizate sunt realizate pe module funcționale iar în al doilea caz se folosesc integratoarele. Acestea permit determinarea concentrației componenților prin integrarea automată a picului cromatografic fiind o metodă eficientă, mai ales în cazul componenților în urme. Integratoarele mecanice cu disc, cele mai utilizate în cromatografia de gaze, se pot adapta la înregistratoarele care funcționează cu derularea hârtiei.

Urma peniței înregistratorului este înregistrată la partea inferioară a cromatogramei și viteza sa de deplasare este proporțională cu distanța peniței înregistratorului de la linia de bază (figura de mai jos).

Figura 4. Exemplu de cromatogramă cuplată cu integrator

Integratoarele electronice digitale imprimă în mod automat suprafaţa picurilor, au un interval foarte larg de liniaritate, sunt foarte sensibile dar şi foarte scumpe.

10.5. APLICAŢII

Cromatografia de gaze se aplică cu succes în analiza unor compuşi din domenii variate, organice sau anorganice. Iată câteva exemple ilustrative:

1. ***în analiza aerului poluat***; s-au pus astfel în evidenţă compuşi organo-metalici cu Pb; hidrocarburi; compuşi cu S; CO; aldehide; cetone etc;

2. ***în analiza pesticidelor***; s-au pus în evidenţă astfel: Lindan; Aldrin; heptaclor-epoxid; Dieldrin; DDT etc;

3. ***în domeniul biomedical***; s-au separat o serie de anestezice (benzocaina, lidocaina, procaina, oxiprocaina, pantocaina, novesin, nupercaina);

4. ***în domeniul industriei alimentare, al industriei petroliere, al produselor farmaceutice,*** etc;

5. ***în domeniul analizei urmelor*** folosind ca şi coloane capilare flexibile confecţionate din silicagel topit. Procedând astfel s-au putut executa separări care pe coloana convenţională erau imposibile (separarea fenolilor la nivel de nanograme).

11. CROMATOGRAFIA PLANĂ

Include cromatografia pe hârtie şi pe strat subţire. Se caracterizează prin forma geometrică plană a suportului fazei staţionare. Separarea se bazează, ca şi în celelalte tehnici cromatografice, pe distribuţia componenţilor din probă între două faze, dintre care una mobilă, lichidă şi cealaltă staţionară, constituită fie din hârtia cromatografică cu calităţi superioare fie dintr-un strat subţire microgranular întins pe o placă. În urma distribuţiilor selective rezultă migrarea diferenţială şi în final separarea.

11.1. ASPECTE TEORETICE

Elaborarea teoriei cromatografice în cromatografia plană este dificilă, deoarece fenomenele care intervin sunt foarte complexe.

Astfel, viteza fluxului de fază mobilă nu poate fi controlată ca în cromatografia pe coloană, deoarece depinde de tensiunea superficială şi de vâscozitatea lichidului mobil, în afară de natura fazei staţionare.

Aceasta are o structură complexă, constituită din canale capilare perpendiculare pe direcţia curgerii. Cu cât este mai eterogenă mărimea acestor capilare cu atât variaţia în flux este mai mare. Din măsurătorile experimentale s-au tras următoarele concluzii:

1. viteza frontului solventului este proporţională cu tensiunea superficială (τ) şi invers proporţională cu vâscozitatea (η), adică cu raportul $\frac{\tau}{\eta} = K = ct$;

2. viteza este invers proporţională cu distanţa de deplasare a frontului (L_f)

Deci se poate scrie:

$$V_f = \frac{K}{2L_f} \tag{1}$$

Prin urmare, curgerea nu este constantă, în funcție de distanță sau în funcție de timp, nu poate fi controlată, aceasta constituind principalul obstacol în tratarea teoretică.

În fiecare punct de pe placă sau hârtie se stabilește un echilibru între fracțiunea solutului reținută de faza staționară și cea antrenată de faza mobilă. Acest raport (R_F) este dat de expresia:

$$R_F = \frac{1}{\left[\left(1+\frac{m_s}{V_M}\right)D\right]} \tag{2}$$

unde: m_s = masa fazei staționare; V_M = volumul fazei mobile; D = coeficient de distribuție.

În literatura de specialitate există tabele cu coeficienți de retenție (R_F) pentru diferiți componenți în funcție de faza mobilă lichidă.

Ca și cromatografia pe coloană, rezoluția a două zone corespunzătoare componenților 1 și 2 este legată de separarea relativă și de dispersia zonelor:

$$R_S = \frac{d_2 - d_1}{2(\sigma_1 + \sigma_2)} \tag{3}$$

unde: d_2-d_1= separarea relativă între centrele a două zone; σ_1 și σ_2 - dispersia zonelor individuale.

Pentru $R_S \geq 1$ cele două zone (pete) sunt aproape complet separate; pentru valori $R_S \approx 1{,}5$ separarea este completă iar pentru $R_S < 1$ separarea este parțială sau nulă.

De remarcat că separările prin cromatografia pe strat subțire prezintă rezoluții superioare celor obținute prin cromatografia pe hârtie.

11.2. MATERIALE CROMATOGRAFICE

11.2.1. Faza staționară

Hârtia cromatografică este fabricată din celuloză pură. Grosimea ei variază în funcție de natura și cantitatea substanțelor de separat. Hârtiile cromatografice cele mai utilizate sunt: hârtia Watman, hârtia Schüll, hârtia Munktell și hârtia Arches.

În scopuri speciale, hârtia cromatografică din celuloză poate fi modificată prin impregnare cu diverse substanțe sau prin introducerea în procesul de fabricație a rășinilor schimbătoare de ioni.

Stratul subțire este diversificat în funcție de mecanismul cromatografiei adaptat pentru separare. În cromatografia de repartiție faza staționară este un lichid fixat pe un suport inactiv.

În cea de adsorbție, stratul subțire este o substanță solidă cu proprietăți adsorbitive. Dacă se apelează la mecanismul de schimb ionic se folosesc straturi subțiri formate din schimbători de ioni. Materialele frecvent folosite ca straturi subțiri sunt următoarele: silicagel, alumină, kiselgur, celuloză, poliamide, sticla pulbere, xerogelurile, iar recent firma Kodak livrează filme cromatografice.

11.2.2. Faza mobilă

Este constituită dintr-un solvent sau dintr-un amestec de solvenţi, amestecul butanol – acid acetic – apă fiind cel mai folosit. Solvenţii se selecţionează în functie de parametrul Snyder (ε^0) pentru adsorbţie sau de parametrul de solubilitate Hildebrand (δ) pentru repartiţie în acest scop se consultă diferitele tabele cu serii eluotrope.

11.3. APARATURA

Există mai multe tipuri de aparate comercializate sud diferite denumiri: Camag, Chromatoset, Pleuger, etc. Developarea pe hârtie sau strat subţire se realizează într-un spaţiu închis – camera de developare – cu atmosferă saturată. Aceste camere au diferite forme: cilindrice, paralelipipedice. Dacă tehnica standard nu permite rezoluţii satisfăcătoare se apelează la tehnici speciale cum sunt:

1. cromatografia pe etape monodimensională care creşte în developări succesive, după uscarea plăcii pe aceeaşi direcţie şi cu acelaşi sau alţi solvenţi;

2. cromatografia bidimensională se realizează cu două developări pe direcţii diferite cu solvenţi de polarităţi diferite, după uscarea intermediară a plăcii;

3. cromatografia cu front pierdut sau cu developare continuă se aplică pentru componenţii cu valori foarte mici ale R_F;

4. cromatografia cu gradient de eluţie utilizează o fază mobilă cu putere eluantă continuu crescătoare, modificată în timpul eluării;

5. cromatografia cu gradient de adsorbţie constă în aplicarea unui strat de sorbent cu activitate crescătoare;

6. cromatografia cu developare multiplă programată.

Revelarea este operația de punere în evidență a zonelor separate, corespunzătoare diferiților componenți. Practic această operație se realizează prin pulverizarea benzilor cu soluții adecvate.

Spoturile revelate se identifică prin:

- ***metode optice***, absorbție UV, după încorporarea în strat a unui indicator fluorescent – (fluoresceina, Rodamina B, mosin, etc.);
- ***metode chimice***, folosind reactivi oxidanți, reducători, de culoare sau reactivi specifici.

11.4. ANALIZA

Analiza calitativă. Principala metodă de identificare prin cromatografia pe hârtie sau pe strat subțire constă în localizarea zonelor diferiților componenți separați și prin măsurarea valorilor R_F corespunzătoare.

Există tabele care indică valori R_F pentru numeroase substanțe, în anumite condiții experimentale.

Analiza cantitativă. Cele mai utilizate metode sunt:

- determinarea densității optice care se bazează pe măsurarea transmitanței, reflectanței sau fluorescenței obținute prin baleiajul cromatogramei și înregistrarea automată a semnalelor emise;
- măsurarea radioactivității pe zone mici, dacă se folosesc trasori radioactivi sau dacă se tratează cu reactivi radioactivi înainte sau după cromatografiere;
- compararea suprafeței spoturilor de concentrație necunoscută cu suprafața unor probe etalon de concentrație cunoscută

Pentru determinări de precizie înaintată se folosesc ***tehnici asociate*** ca:

a) cuplarea cu cromatografia în fază gazoasă. În acest tip de asociere, componenţii care părăsesc coloana cromatografică sunt condensaţi pe o placă, eluaţi şi revelaţi, obţinându-se ca indicaţii: timpii de retenţie şi polarităţile relative (R_F);

b) cuplarea cu spectrometria de masă;

c) cuplarea cu spectrometria I.R.

11.5. APLICAŢII

Cromatografia plană este foarte des folosită deoarece se poate executa cu mijloace de laborator uşor accesibile. Aceasta tehnică este aplicată în domenii variate ca: poluanţi, insecticide, pesticide, medicamente, alcaloizi, substanţe anorganice, etc.

Cromatografia pe strat subţire s-a impus şi mai mult în ultimul timp datorită următoarelor avantaje:

- rapiditate;
- rezoluţie mai bună;
- selectivitate superioară;
- sensibilitatea decelării de cca. 100 ori mai mare decât pe hârtie (se pot decela cantităţi de ordinul 1/100 μg);
- domenii de aplicabilitate mult mai largi.

Separările pe hârtie utilizând metoda directă a folosit la separarea aminoacizilor, acizilor graşi, fenoli, coloranţi alimentari, medicamente, cationi şi anioni anorganici, etc.

Separări deosebit de bune s-au obţinut la fracţionarea unor produşi naturali prin tehnica aplicării consecutive a unor straturi de diferite compoziţii sau lucrând cu gradient de strat.

Astfel au fost separate prin tehnica bidimensională amestecuri de lipide utilizând pe o direcție mecanismul de adsorbție pe silicagel, iar pe a doua direcție mecanismul de sorbție selectivă (silicagel impregnat cu 5 % $AgNO_3$) utilizând ca fază mobilă amestecul binar eter de petrol și eter etilic 9:1.

Prin aceeași tehnică s-a realizat separarea unui amestec complex de alcaloizi folosind ca adsorbanți alumina iar ca solvent cloroform-metanol 19:1.

Prin tehnica cromatografiei pe strat subțire de înaltă performanță au fost separate și apoi determinate cantități de ordinul 10 pg - 100 ng.

Din hormoni naturali folosind plăci de silicagel cu o granulație de 60 Å, faza mobilă cloroform: metanol (97: 3), detecție: acid percloric: metanol (5:95) sau UV 366 nm.

Metoda cromatografiei plane, spre deosebire de cromatografia pe coloană în faza lichidă prezintă unele deficiențe și anume:

- puterea de izolare este inferioară;
- reproductibilitatea valorilor R_F este destul de rară, datorită fenomenelor de tip „marginal" ca o consecință a evaporărilor;
- apar fenomene de dispersie cauzate de adsorbții sau modificări chimice auxiliare (ionizări, complexări) generate de impuritățile din strat;
- rezoluția pe coloană este net superioară și obținută într-un interval de timp sensibil mai scurt.

12. EXTRACȚIA CROMATOGRAFICĂ

Extracția cromatografică este un procedeu care îmbină avantajele separărilor prin extracție cu solvenți nemiscibili cu cele ale cromatografiei. Deosebirea între extracția cromatografică și cromatografia de repartiție normală constă în interacțiile la care participă solutul în timpul procesului de distribuție. În timpul progresării prin coloană, în cromatografie, solutul nu suferă perturbări chimice semnificative, în timp ce în extracția cromatografică transferul interfazic al speciei este însoțit de modificări chimice complexe rezultate din numeroase interacții și echilibre.

Procedeul a fost inițiat de ***Sikierski*** în analiza unor combustibili nucleari. Orice procedeu efectuat prin extracție cromatografică include două etape: formarea unui complex cu un reactiv dizolvat în faza apoasă și transferul acestuia din faza apoasă în faza organică. Aceste două procese se repetă succesiv de-a lungul coloanei cromatografice.

Aspectele teoretice care constituie baza dezvoltării și optimizării procedeului sunt comune cu cele prezentate în cadrul capitolelor de separare bazate pe extracția cu solvenți nemiscibili și prin cromatografie. Cele două procedee sunt strâns corelate atât din punct de vedere teoretic cât și practic.

Aproape toate sistemele de separare folosite în extracția cu solvenți se pot realiza într-o coloană cromatografică. Extracția cromatografică s-a dezvoltat totuși pe de o parte datorită eficienței ei superioare, iar pe de altă parte a permis realizarea unor separări dificile ale unor elemente cu proprietăți similare.

Tipul de coloană care se folosește depinde de condițiile operaționale selecționate: capacitate, presiune, temperatură, manipulare manuală sau automată, etc. În

extracția cromatografică suportul are o mare importanță. În esență, rolul suportului constă în a reține în coloană faza staționară sub forma unei pelicule cât mai uniforme și mai ales subțire, ceea ce are drept consecință stabilirea rapidă a echilibrului de distribuție între faza apoasă și cea organică, eliminând efectele de dispersie.

Materialele folosite ca suport în extracția cromatografică sunt împărțite în două categorii. Prima grupă cuprinde suporții a căror suprafață este acoperită cu grupe hidroxil și în consecință, pot fi deosebit de bine umeziți cu lichide polare. Acestea sunt: kiselgurul, silicagelul, alumina, celuloza. A doua grupă de suporți include diferiți polimeri organici: P.E., PTFE, comercializate sub diferite denumiri.

12.1. FAZE STAȚIONARE ORGANICE PE SUPORT INERT

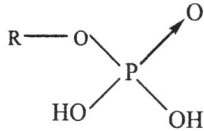
Selectivitatea coloanei este strâns legată de natura fazei staționare. Fazele staționare trebuie să prezinte următoarele caracteristici:

1. retenție bună și selectivă (rezultând din factorii de distribuție interfazică și din rezoluție);
2. eficiență optimă (evaluate prin termenii de talere teoretice);
3. reproductibilitatea rezultatelor;
4. posibilitatea de regenerare rapidă și cantitativă

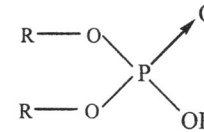
După o clasificare general acceptată, extractanții folosiți ca faze staționare se grupează în: extractanți acizi, compuși organo-fosforici neutri și amine sau săruri cuaternare de amoniu.

Extractanții acizi sunt compuși organici care au o grupare acidă în moleculă. Comportarea lor se manifestă prin schimbarea ionilor de hidrogen cu cationii prezenți în soluția apoasă ceea ce a sugerat denumirea lor de

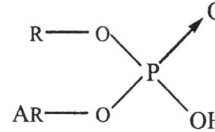
„schimbători cationici lichizi". Cei mai importanţi acizi organo-fosforici folosiţi sunt:



acid monoalchil-fosforic



acid dialchil-fosforic



acid alchil-aril-fosforic

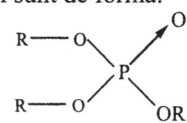
Parametrii de retenţie depind foarte mult de pH-ul din soluţia apoasă (creşterea pH-ului duce la micşorarea volumelor de retenţie).

Extracţia cromatografică se aplică frecvent pentru extracţia elementelor în urme, în care caz rezultate foarte bune s-au obţinut folosind ca extractant acidul di(2-etilhexil) fosforic (HDEHP).

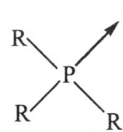
Practic s-a constatat că numărul de molecule de extractant legate de metal depinde de sarcina formei ionice care se extrage din mediul apos şi de numărul de coordinare al metalului inclus. Prezenţa unor liganzi care participă competiţional la complexarea speciei angajate în procesul de extracţie micşorează în mod sensibil randamentul extracţiei.

Extractanţii organo-fosforici neutri

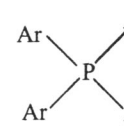
Cei mai folosiţi sunt de forma:



trialchilfosfat



trialchilfosfinoxid



triarilfosfinoxid

Dintre aceştia cel mai important reactiv utilizat în extracţia cromatografică este tri-n-butilfosfat (TBP). Mecanismul de extracţie se bazează pe substituirea apei, solvatând astfel speciile iniţial prezente în soluţia apoasă.

Extracţia cationului metalic rezultă din competiţia între extractant, apă şi anion (sau alt ligand) ce poate fi prezent în soluţia apoasă.

Coeficienţii de extracţie mari, se obţin numai din soluţii cu tării ionice ridicate, unde captivitatea apei este mică şi efectul său competitiv este neglijabil. Tăriile ionice înalte favorizează formarea speciilor metalice neionizate, esenţiale în extracţie.

Utilizând TBP ca agent de extracţie au fost extrase din medii acide: actinidele; U (VI); Zr; Hf; Au; Fe; Ga; In; Tl (III).

Extractanţii organici bazici folosiţi în mod curent sunt aminele cu M mare şi sărurile cuaternare de amoniu, numite adesea şi ***„schimbători de anioni lichizi"***.

Folosirea lor în extracţia cromatografică prezintă unele avantaje printre care: capacitate de extracţie bună, stabilitate chimică mare şi solubilitate mică în soluţii apoase.

În fiecare clasă de amine solubilitatea este cu atât mai mică cu cât este mai lung lanţul alchil, putând ajunge la valori extrem de mici (de ex: amină terţiară cu mai mult de 8 atomi de carbon se dizolvă în apă sub 5 ppm).

Aminele reacționează cu acizii din soluția apoasă, formând săruri de amoniu de tipul $R_3NH^+A^-$ adică o pereche ionică cu caracter polar. Extracția speciilor anorganice, din soluții apoase în faza organică are loc după o reacție de schimb ionic.

Schematizat, procesul constă din rezultatul competiției între cationul organic mare şi specia anionică metalică sau anionul acidului mineral. Ca regulă generală coeficientul de distribuție al celor două sau mai multe metale extractibile crește odată cu concentrația acidului, deoarece se formează mai uşor complexul anionic.

La concentrații foarte mari însă se amplifică competiția extracției între acid şi specia incluzând elementul de extras. Aceasta impune operarea la valoarea maximă de pe curba de variație a coeficientului de distribuție a speciei în funcție de concentrația acidului.

În mod curent se utilizează HCl deoarece acesta dă uşor clorocomplecşi anionici. Dintre aminele cele mai folosite menționăm aminele secundare: Amberlit LA-1 şi LA-2; terțiare: tri-n-octilamina, tri-i-octilamina, iar dintre sărurile cuaternare de amoniu: Aliquat 336 (sarea de amoniu trilaurilmonometil). Nu s-au înregistrat lucrări incluzând în faza staționară amine primare.

12.2. FAZE STAȚIONARE APOASE PE SCHIMBĂTORI DE IONI

O tehnică de separare de înaltă performață s-a realizat prin asocierea răşinilor schimbătoare de ioni cu extracția cu solvenți organici. Aceasta se poate obține folosind un schimbător de ioni solid ca suport şi un sistem parțial neapos ca fază mobilă, care acționează ca extractant pentru anumiți ioni metalici.

La punerea în contact a unei răşini schimbătoare de ioni îmbibată cu apă, cu un solvent organic nemiscibil cu apa, se pot considera trei faze coprezente:

- ✓ granulele de răşină;
- ✓ solventul organic;
- ✓ filmul de apă datorat solvatării grupelor funcţionale ale răşinii schimbătoare de ioni.

Între cele trei faze au loc două feluri de echilibre:

- ➢ echilibrul de repartiţie între faza organică şi filmul apos;
- ➢ echilibrul de schimb ionic şi de repartiţie a moleculelor între filmul apos şi răşină.

Selectivitatea metodei poate fi manipulată favorabil prin alegerea convenabilă a componentului organic lichid, a agentului complexant şi a materialului solid schimbător de ioni.

Metoda este superioară atât cromatografiei de schimb ionic în soluţii apoase cât şi metodei de extracţie lichid-lichid convenţionale. Comparativ cu metodele menţionate, principalele avantaje sunt:

- ➲ după îndepărtarea unuia sau a mai multor componenţi, se mai pot efectua separări ale altor elemente pe materialul solid schimbător;
- ➲ nu sunt necesari agenţi de salifiere sau concentraţii mari de acizi tari;
- ➲ constituentul principal poate fi prezent în cantităţi mari fără să afecteze separările.

Datorită acestor calităţi procedeul este mult folosit, în special, când este necesară o separare între constituenţi minori.

Prin acest procedeu a fost extras uraniu cu TBP în prezenţa unor cantităţi mari de HNO_3; a fost separat aurul de metalele platinice, precum şi de Co; Cu; Hg; U(VI) în prezenţa unui diluant (metilglicolul).

Folosirea largă a germaniului în industria electrotehnică a impus o purificare înaintată a acestuia. Aceasta se poate realiza cu un sistem constituit din soluţii clorhidrice în prezenţa de TBP şi adaos de petrol lampant.

Extracţia începe la 3 m HCl şi prezintă un maxim la 7,8 m HCl. Prin acelaşi procedeu s-a realizat separarea ytriului. Extracţia are loc din soluţie de azotat de ytriu, utilizând ca fază staţionară şi fază mobilă TBP în toluen. Drept suport anionit s-a utilizat o răşină Dowex 1.

Utilizând ca extractant tri-noctilfosfin – oxidul (TOPO) s-au elaborat o serie de metode de separare de mare performanţă a unor elemente în urme (separarea Hf de Zr; separarea Th-ului din pământurile rare).

O extracţie cantitativă s-a realizat cu tetrahidrofuran în HNO_3 pe cationitul Dowex 50 la separarea şi purificarea uraniului. În acest mod s-a separat fierul de Co; Ni; Al. În ultimul timp au apărut lucrări care folosesc extracţia cu agenţi de chelatizare (acetil-acetona; 8-hidroxichinolina, ditizona şi dimetil-glioxima).

Din determinările practice s-a constatat că extracţia creşte cu scăderea concentraţiei în extractant şi depinde de tipul de răşină utilizat.

13. METODE DE SEPARARE BAZATE PE VITEZA DE TRANSPORT

Acestea sunt metode care permit separarea componenţilor unui amestec în soluţie pe baza diferenţelor lor de migrare atunci când sunt supuşi acţiunii unui câmp electric.

Acest procedeu nu se aplică decât particulelor încărcate pozitiv sau negativ, particule care sunt atrase de către polii opuşi ai câmpului electric: natura şi mărimea acestor particule sunt foarte diferite.

Aceste particule pot fi: ioni metalici, macroioni coloidali precum proteinele ale căror mase moleculare sunt de ordinul 10^5 -10^6 sau alţi compuşi care pot fi transformaţi în particule cu sarcină, prin formare de complecşi, chelaţi, etc.

Se atribuie, în general, denumirea de ***electroforeză*** deplasărilor particulelor coloidale, micelelor sau macromoleculelor, într-un câmp electric şi denumirea de ***ionoforeză*** deplasărilor ionilor relativ mici.

Separarea electroforetică se bazează pe viteza de migrare diferenţială a componenţilor într-o fază lichidă, fără ca aceştia să sufere reacţii la electrozi.

După modul de realizare, metodele de electroforeză se împart în trei clase:

1) electroforeza într-un mediu liber–nelegat (pe coloana de lichid);

2) electroforeza într-un mediu fixat, sau electroforeza zonală (pe suport poros);

3) electroforeza continuă sau discontinuă.

13.1. STUDIUL TEORETIC AL DEPLASĂRII ELECTROFORETICE. ORIGINEA SARCINILOR

Substanţele care posedă grupări funcţionale capabile de a ioniza în soluţie dau naştere unor particule încărcate pozitiv sau negativ. Această ionizare depinde nu numai de natura compuşilor dar şi de mediul înconjurător care intervine prin compoziţia sa, pH-ul său, forţa sa ionică.

Dacă în cazul ionilor metalici această ionizare este relativ simplă, ea devine mult mai complexă în cazul moleculelor organice amfotere. În cazul aminoacizilor, există mai multe posibilităţi: în funcţie de pH pot exista fie anioni, fie cationi, fie amfiioni. În ultimul caz molecula se află la punctul său izoionic.

Atunci când această ionizare se petrece într-un mediu complex format din alţi cationi decât protonii, sau când grupările carboxil sunt legate de ioni minerali ca: Na^+, K^+, Ca^{2+}, etc. pH-ul punctului izoionic definit în apa pură nu mai corespunde exact celui pentru care aceste molecule au o migrare electroforetică nulă. Există situaţii particulare (cazul proteinelor) care posedă numeroase grupări carboxil la care, cu toate purificările repetate, rămân legaţi cationii minerali.

Se defineşte astfel ***punctul izoelectric*** ca fiind valoarea pH-ului pentru care nu există nici o migrare electroforetică. Diferenţa între cele două valori de pH pentru un compus dat depinde de natura soluţiei şi de concentraţia sa în electroliţi. Exemplu: pentru serul de albumină în apa pură punctul izoionic este 5,37 iar în NaCl 0.15 m este 4,4.

În general, sarcina electrică a unei molecule sau a unei particule solide este notată cu Q dar, în cazul macromoleculelor în soluţie, se are în vedere nu numai această sarcină dar şi potenţialul care apare la suprafaţa acestei macromolecule solvatate. Valoarea sa numită ***potenţial electrocinetic*** intervine în mişcarea electroforetică.

El se exprimă fie în raport de mărimea particulei şi a solventului fie de constanta dielectrică ε; acesta este potenţialul electrocinetic zeta ζ fie în raport de solvent şi în acest caz se ţine seama şi de ionii prezenţi; acesta este potenţialul electrocinetic zeta ζ'.

Potenţialul electrocinetic zeta ζ. Dacă o macromoleculă este ionizată într-un solvent, potenţialul care apare la suprafaţa sa se datorează repartiţiei de sarcini şi dacă acest solvent este pur, el este egal cu:

$$\zeta = \frac{Q}{\varepsilon \cdot r} \qquad (1)$$

unde: Q-sarcina electrică; r-raza particulei, ε-constanta dielectrică a mediului.

Potenţialul electrocinetic zeta ζ'. În realitate, solventul include ionii care sunt atraşi de sarcinile opuse apărute pe particulă. Aceasta conduce la apariţia unei noi repartiţii în interiorul mediului şi la crearea unui ansamblu a cărui neutralitate electrică nu este atinsă decât la o anumită distanţă de particulă.

Câmpul electric se va exercita nu numai asupra macromoleculei ci şi asupra zonei ionice din jurul acesteia:

$$\zeta' = \frac{\zeta}{1 + A \cdot r\sqrt{\mu}} \qquad (2)$$

unde μ este tăria ionică a mediului.

Substituind relaţia (1) în (2), se obţine expresia:

$$\zeta' = \frac{Q}{\varepsilon \cdot r} \cdot \frac{\zeta}{1 + A \cdot r\sqrt{\mu}} \qquad (3)$$

unde A este o constantă la o anumită temperatură şi mediu dielectric definit. Exemplu pentru apă la 5°C, $A=0,35\cdot10^8$.

Acest potenţial electrocinetic ζ', responsabil de deplasare, este inferior potenţialului electrocinetic ideal ζ. Acesta poate fi reprezentat în modul indicat în figura 1.

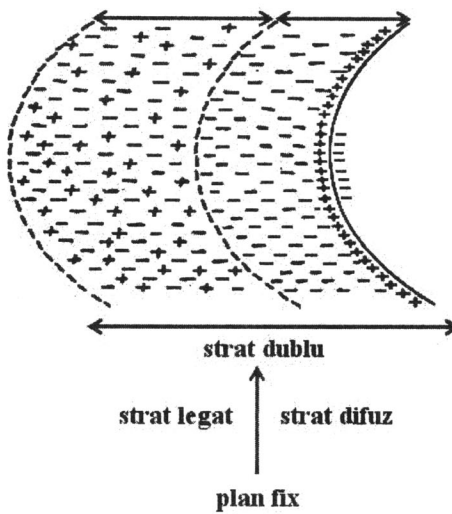


Figura 1. Variaţia potenţialului electrocinetic ZETA într-un solvent neutru

Când un lichid este în contact cu un solid, la interfaţa dintre ele apar sarcini electrice de semne contrare iar electroneutralitatea soluţiei se găseşte la o anumită distanţă de solid. Acesta este înconjurat de un volum de lichid în care se redistribuie sarcinile electrice. Acest volum este considerat ca fiind format de un înveliş dublu:

- unul strâns legat de suprafaţă în care potenţialul variază brusc limitat de planul b-b';

- altul în care variația potențialului este mult mai mare numit „strat difuz".

Dacă, de exemplu, o particulă macromoleculară este încărcată negativ unele sarcini pozitive se adsorb la suprafața a-a'. Ionii negativi ai soluției vor fi atrași de această suprafață și vor constitui primul strat strâns legat, limitat de planul b-b'. Acest prim strat formează o particulă rigidă, inseparabilă de particula care realizează un veritabil ansamblu electrostatic asupra căruia se exercită câmpul electric care se deplasează în același timp cu particula.

Privind din acest plan, sarcinile se distribuie astfel încât să se ajungă la electroneutralitate. Planul cc' reprezintă limita acestui strat difuz.

Grosimea primului strat și valoarea potențialului electrocinetic ζ, în cazul unui solvent pur depinde de constanta sa dielectrică, de potențialul electrocinetic ζ', în cazul unei soluții ionice, ζ' depinde în plus de tăria sa ionică și este invers proporțional cu ε, μ și r.

În funcție de ponderea sarcinilor între aa' și bb', potențialul electrocinetic ζ', va fi pozitiv sau negativ (vezi figura 2):

1. dacă sarcinile negative sunt mai puține decât cele pozitive, potențialul va fi pozitiv, $\zeta_1' > 0$;
2. dacă sunt mai multe sarcini negative decât cele pozitive, potențialul va fi negativ, $\zeta_2' > 0$.

În cele două cazuri, aceste potențiale electrocinetice vor fi definite prin diferența de potențial existentă între planul bb' și electroneutralitatea soluției pentru planul cc'. Aceste potențiale electrocinetice sunt inferioare potențialului electrotermodinamic (potențial Nernst) de la suprafața aa' a particulei.

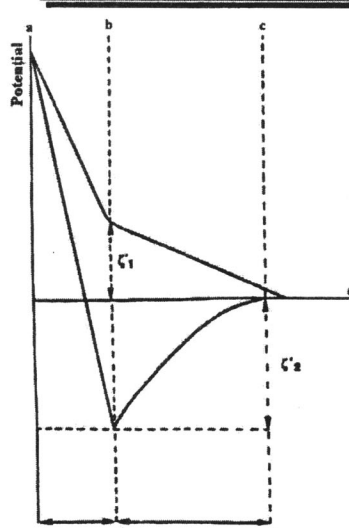


Figura 2. Dependența potențialului electrocinetic ZETA de ponderea sarcinilor

13.2. FACTORII CARE AFECTEAZĂ MIGRAREA IONILOR

O particulă încărcată electric, când este dizolvată sau suspendată într-un mediu lichid, sub influența unui câmp electric uniform, atinge o viteză constantă de migrare.

Speciile încărcate pozitiv se vor deplasa către catod, iar cele încărcate negativ către anod. Viteza de migrare a ambelor specii va fi determinată de forțele care acționează asupra lor.

Aceste forţe sunt:

a) forţa de atracţie electroforetică F_1 care este dată de produsul dintre sarcina Q a entităţii electrocinetice şi intensitatea E a câmpului electric aplicat:

$$F_1 = Q \cdot E \tag{4}$$

b) forţa de frecare Stokes F_2 dată de produsul dintre coeficientul de vâscozitate dinamică (η), raza particulei (r) şi viteza electroforetică (v):

$$F_2 = 6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \tag{5}$$

În afara acestor două forţe, mai trebuie avute în vedere încă două forţe, datorită prezenţei ionilor electrolitului. Câmpul electric exercită o atracţie asupra acestor ioni, cauzând o frânare electrolitică dată de ***ecuaţia Debye-Hückel***:

$$F_3 = (Q - \varepsilon \cdot \xi \cdot r) \cdot E \tag{6}$$

unde: ξ = potenţialul electrocinetic adică valoarea potenţialului la limita de demarcaţie între stratul absorbant şi faza mobilă.

Ultima forţă F_4 se datoreşte efectului de relaxare, fiind produsă de distrugerea distribuţiei atmosferei ionice, datorită diferenţei de mişcare a contraionilor şi particulelor coloidale. Imediat după aplicarea câmpului electric, suma vectorială a acestor patru forţe este egală cu zero şi viteza electroforetică (v) devine constantă:

$$\vec{F}_1 + \vec{F}_2 + \vec{F}_3 + \vec{F}_4 = 0 \tag{7}$$

Neglijând efectul de relaxare şi ţinând cont de direcţiile celor trei forţe se obţine:

$$Q \cdot E - 6\pi\eta \cdot r \cdot v - (Q - \varepsilon \cdot \xi \cdot r) \cdot E = 0 \qquad (8)$$

de unde:

$$v = \frac{\varepsilon \cdot \xi \cdot E}{6\pi\eta} \qquad (9)$$

Mobilitatea electroforetică (μ) se defineşte ca raportul dintre viteza şi intensitatea câmpului (E):

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{\varepsilon \cdot \xi}{6\pi\eta}, \quad <\mu> = \frac{cm/s}{V/cm} = \frac{cm^2}{V \cdot s} \qquad (10)$$

13.3. REZOLUŢIA

Din ecuaţia (10) se poate estima distanţa de deplasare, d = v·t, a unei zone în procesul de separare electroforetic:

$$\mu = \frac{v}{E} \text{ dar } v = \frac{d}{t} \text{ deci:}$$

$$\mu = \frac{d}{t \cdot E} \text{ şi deci } d = \mu \cdot t \cdot E \qquad (11)$$

Pentru doi componenţi, distanţa dintre centrele zonelor Δd, după timpul de migrare t, va fi:

$$\Delta d = d_1 - d_2 = (\mu_1 - \mu_2) \cdot t \cdot E \qquad (12)$$

Ecuația de definire a rezoluției este:

$$R_S = \frac{2\Delta d}{x_1 + x_2} \tag{13}$$

unde x_1 și x_2 sunt lățimile benzilor celor doi componenți. Înlocuind ecuația (12) în (13) se obține:

$$R_S = 2 \cdot \frac{\mu_1 - \mu_2}{x_1 + x_2} \cdot t \cdot E \tag{14}$$

Cei doi componenți vor fi separați dacă $R_S > 1$. Din ecuația (14) se constată că lărgimea zonelor joacă un rol hotărâtor în separarea celor doi componenți și de aceea trebuie să se țină seama de toți factorii de care depinde acest parametru.

13.4 TEHNICI ELECTROFORETICE

Se aplică actualmente mai multe metode:

- ***electroforeza de frontieră***, aplicată pentru studiile fundamentale privind natura și puritatea proteinelor;
- **electroforeza de zonă sau de suport**, mult mai ușor de utilizat și din acest motiv este de uz cotidian în biologia clinică pentru studiul fracțiilor proteice din ser.

13.4.1 Electroforeza pe coloană de lichid (electroforeza de frontieră)

Această metodă propusă de Tiselius în 1937 constă în determinarea mișcării unui amestec complex de proteine într-o soluție tampon de electroliți. Aparatul imaginat de Tiselius este o celulă alcătuită dintr-un tub în formă de U de

secțiune pătrată ai cărui pereți de sticlă permit observarea optică a migrării proteinelor: refractometric sau spectrofotometric.

Această celulă cuprinde trei părți (vezi figura 3):

- partea inferioară a tubului în formă de U;
- cele două ramuri ascendente ale tubului.

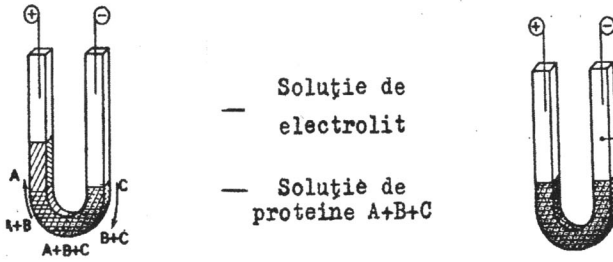


Figura 3. Electroforeza de frontieră

Amestecul de analizat conținând spre exemplu trei proteine A,B şi C încărcate negativ într-o soluție apoasă de electrolit, ocupă partea inferioară a tubului. Apoi, cu foarte mare atenție, în scopul neamestecării fazelor, cele două ramuri ascendente sunt umplute numai cu soluție de electrolit. Ansamblu este riguros etanşat. Se observă două frontiere foarte nete între soluția de proteină şi soluțiile de electroliți.

În cele două ramuri se plasează câte un electrod alimentat cu curent continuu de la un generator astfel că între ei să se stabilească o diferență de potențial de 100-150 V.

Se observă o migrare a proteinei spre polul pozitiv, cu viteze diferite, în funcție de natura lor. Proteinele având mobilități extreme, în figura A şi C sunt în stare aproape pură în cele două regiuni ale stratului lichid şi sunt separate

prin zone intermediare. În interiorul fiecărei regiuni se stabileşte un gradient de concentraţie.

Dificultatea metodei constă în a localiza bine diferitele frontiere care, sub efectul difuziei şi al convecţiei au tendinţa de a se etala. Pentru a limita aceste fenomene trebuie luate precauţii în vederea stabilităţii termice. Procedeul este lung şi delicat îndeosebi când mobilităţile sunt apropiate dar permite totuşi obţinerea unor măsurători foarte precise.

13.4.2.Electroforeza pe suport poros (electroforeza de zonă)

Termenul de electroforeză pe suport poros sau ***electroforeză zonală*** se referă la un grup de tehnici înrudite, caracterizate prin separarea componenţilor în zone izolate, într-un mediu lichid fixat într-un suport poros (hârtie sau strat subţire de silicagel).

Aparatul pentru electroforeză zonală este format dintr-o cameră de electroliză şi un redresor de curent continuu stabilizat (vezi figura de mai jos).

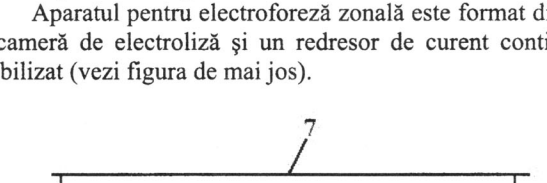


Figura 4. Aparat pentru electroforeză zonală

Camera de electroforeză este construită din material plastic şi este prevăzută cu două recipiente (1) pentru soluţia tampon (2), reunite printr-o punte centrală (3). În cele două

celule (1) se află montați doi electrozi de Pt (4), un catod și un anod. Recipientul este prevăzut cu un stativ (5) din textolit pentru susținerea benzilor de hârtie (6) și un capac (7) pentru închiderea camerei.

Prin această tehnică se separă eficient proteinele. O etapă importantă este colorarea proteinelor după ce au fost separate. Mediul suport (hârtia cromatografică) este fixat după electroforeză prin introducere în metanol, etanol sau acid, prin încălzire, făcând proteinele insolubile. Benzile sunt apoi revelate cu albastru de bromfenol, spălate în băi de CH_3COOH 2 % și uscate.

Pentru determinarea cantitativă se utilizează densitometre prin reflexie, transmisie sau combinate. Majoritatea densitometrelor dispun de sisteme de integrare a ariei de sub fiecare pic. Un exemplu tipic de densitogramă a serului uman normal arată astfel:

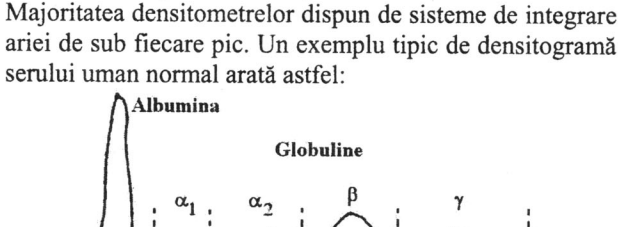


Figura 5. Densitograma serului uman normal

Electroforeza zonală, pe lângă analiza proteinelor, se aplică la separarea aminoacizilor, a acizilor organici cu catenă lungă, a monozaharidelor, glicolilor, a alcaloizilor sau a diferiților ioni anorganici simpli sau complecși.

O combinație interesantă a rezultat între electroforeza de înaltă tensiune și cromatografia plană cunoscută sub numele de „***fingerprint***" (în traducere amprentă). ***Tehnica fingerprint*** este o migrare bidimensională și anume, prima

direcție o cromatografiere obișnuită și a doua direcție o electroforează de înaltă rezoluție. Aceasta tehnică a permis separări spectaculoase ale unor amestecuri complexe.

O alta tehnică rezultă din combinarea electroforezei zonale pe strat subțire de gel cu ***imunodifuziunea–imunoelectroforeza***.

Această tehnică se realizează pe un strat subțire de 1-2 mm de gel de agar întins pe o placă de sticlă. Proba de separat (proteina de exemplu) se introduce într-un lăcaș făcut în stratul de agar, după care urmează electroforeza (4 V/cm) obținându-se astfel separarea componenților din proteină.

13.4.3. Electroforeza cu focalizare izoelectrică

Această tehnică a reprezentat un progres major în domeniul separării, cu o înaltă rezoluție, a proteinelor și a altor molecule amfoterice. Tehnica are la bază principiul migrării electroforetice a unor macromolecule amfotere într-un gradient de pH până în zona în care se atinge punctul lui izoelectric.

Metoda poate fi realizată prin aplicarea unui câmp electric asupra unui sistem electrolitic în care pH-ul este mărit în mod progresiv de la anod la catod. O moleculă amfoterică, de exemplu o proteină, va fi încărcată negativ în partea alcalină a punctului izoelectric și pozitiv în partea acidă. Astfel, proteina va migra electroforetic către catod sau anod până la atingerea pH-ului corespunzător punctului izoelectric la care prezintă o încărcătură zero.

Metoda permite rezoluția unor molecule a căror puncte izoelectrice diferă prin cel puțin 0,005 unități de pH. Acest grad de rezoluție a necesitat cercetări laborioase în vederea descoperirii de transportori amfolitici cu proprietăți specifice.

Rezolvarea acestor probleme este realizată de Svensson care a sintetizat un amestec de acizi alifatici poliamino-policarboxilici, care au însumat cerințele necesare formării gradienților naturali de pH. În aceste condiții a devenit posibilă utilizarea acestei metode în scop analitic privind separarea proteinelor.

13.5 ALTE METODE ELECTROFORETICE

13.5.1 Electroforeza de afinitate

În sens larg, include toate metodele în care un anumit tip de interacțiune specifică are loc între un component din proba supusă electroforezei și alt component prezent în mediu suport; componentul din mediul suport se numește ligand specific. Cu ajutorul acestei metode se detectează componentele dintr-o probă care prezintă afinitate pentru un ligand, se determină omogenitatea sau eterogenitatea legării componentului de ligand, se determină cantitatea de component care leagă ligandul, sau se efectuează studii cantitative privind formarea complexului component-ligand.

Cele mai importante metode privind electroforeza de afinitate sunt: imunoelectroforeza încrucișată, imunoelectroforeza tip rachetă, imunoelectroforeza zonală, imunoafinoelectroforeza încrucișată, electroforeza încrucișată („crosed electrophoresis"), afinoelectroforeza bidimensională și în sfârșit electroforeza de afinitate propriu-zisă.

Ultima variantă, electroforeza de afinitate propriu-zisă, este analoagă cromatografiei de afinitate. Ligandul este imobilizat într-un gel, astfel că proteina, în cursul electroforezei este „împiedicată" și „întârziată" datorită interacțiunii specifice.

Această tehnică este folosită mai ales pentru a detecta şi identifica componentele dintr-o probă care prezintă afinitate pentru ligand; interacţiunea specifică se manifestă prin „întârzierea" componentului cu afinitate pentru ligand, în gelul de afinitate, comparativ cu gelul control. Această interacţiune specifică se poate folosi pentru:

- demonstrarea prezenţei şi numărarea componentelor cu afinitate pentru ligand;
- verificarea omogenităţii legării preparatelor modificate;
- urmărirea desfăşurării şi verificarea reacţiilor de modificare care, potenţial, afectează locul de afinitate pentru ligand;
- evaluarea efectelor diferiţilor factori ca: pH-ul, tăria ionică sau temperatura
- testarea materialelor care urmează a fi folosite în cromatografia de afinitate preparativă.

13.4.2 Imunoelectroforeza

Imunoelectroforeza este o metodă de separare care combină electroforeza în mediu stabilizat (de suport) cu reacţia antigel-anticorp. Această asociere între rezoluţia proprie electroforezei şi specificitatea reacţiilor imunochimice permite caracterizarea calitativă şi cantitativă a amestecurilor complexe de proteine. Cele mai folosite medii suport sunt gelurile de agar sau agaroză şi membranele de acetat de celuloză.

Tehnica de lucru.Gelul de agar sau agaroză se toarnă pe o lamă de microscop ca soluţie fierbinte, iar după formarea gelului se excavează 2 godeuri pentru probe, la o distanţă de 15 mm unul de altul, cu diametrul de 1-2 mm, la jumătatea lungimii gelului de agar sau la aproximativ 1/3 din lungime (spre catod) în cazul gelului de agaroză.

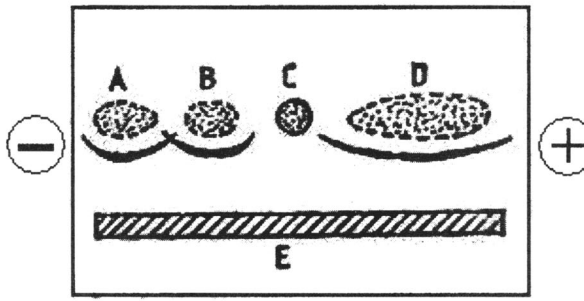


Figura 6. Reprezentarea schematică a imunoelectroforezei calitative: C-godeul cu antigene (A, B şi D); E-şanţ cu imunoser

Lamele cu gelul astfel pregătit se aşază în aparatul de electroforeză, se aplică probele cu antigene de analizat, se conectează la redresor şi se migrează obişnuit la 15-25 V/cm.

După electroforeză se excavează, pe mijlocul gelului, între cele 2 godeuri, un şanţ lung de 65 mm şi lat de 1,5 mm, cu ajutorul unui dispozitiv improvizat din două lame de ras dispuse de o parte şi alta a unei lame de sticlă groasă de 1,5 mm. În acest şanţ se aplică imunoserul cu anticorpii în mod uniform pe toată lungimea sa.

Gelurile se lasă în repaus în camera umedă pentru difuziune iar citirea preparatelor se face în timpul formării liniilor de precipitare ca şi după terminarea completă a difuziunii. Când este necesar gelurile se usucă şi se colorează.

Determinarea cantitativă se face prin raportare la un antigen standard corespondent, de concentraţie cunoscută.

13.5.3 Electroforeza bidimensională

Este în prezent cea mai folosită metodă de separare analitică a macromoleculelor în biologie şi medicină. Primele separări bidimensionale pe baza sarcinii electrice şi a dimensiunilor macromoleculelor au fost efectuate de Smithies şi Poulik (1956) în geluri de amidon.

Punerea în practică a electroforezei bidimensionale ca metodă cu rezoluţie superioară a parcurs câteva etape importante, care au constituit de fapt acumulările cantitative necesare saltului calitativ realizat în 1975. Saltul calitativ este realizat prin performanţele obţinute de Klose cu separarea proteinelor din extractul de pancreas de cobai (1250 spoturi).

Electroforeza bidimensională este considerată cea mai sensibilă metodă de separare a proteinelor. S-a estimat că peste 10.000 de proteine pot fi separate într-un gel în condiţii normale.

Identificarea proteinelor normale şi anormale, caracteristice fiecărei celule, este un obiectiv în curs de realizare în multe laboratoare datorită electroforezei bidimensionale. Se estimează că această metodă va avea cel mai mare impact în laboratorul clinic. Electroforeza bidimensională este folosită şi în studiul polimorfismelor genetice.

Analiza automată a spoturilor cu ajutorul minicalculatorului permite estimări calitative mult mai precise; în acest scop au fost puse la punct mai multe programe. Automatizarea îmbunătăţeşte şi lista de detectare, dar extinde şi spectrul de identificare, atenuând sau chiar eliminând efectele factorilor limitanţi.

Izotahoforeza

Este o metodă de separare în funcție de sarcina electrică. Metoda se folosește pentru separarea particulelor care se deosebesc, în special prin încărcătura electrică netă, și, nu prin dimensiunile fizice. Deoarece vitezele de deplasare ale fracțiunilor, după ce separarea este completă, când s-a atins o stare de echilibru, sunt egale, metoda a căpătat numele de izotahoforeză („izotache phoresis"). Metoda se mai numește concentrare în fază staționară și se realizează în două moduri:

- concentrare selectivă („selective stacking") prin care componentul sau componentele de interes sunt incluse în frontul mobil, iar celelalte componente rămân în afara acestuia („unstacked");
- excluderea selectivă („selective unstacking") prin care componentul sau componentele de interes sunt excluse selectiv din frontul mobil, iar celelalte componente sunt incluse în acesta.

În cazul izotahoforezei separarea se face prin concentrare selectivă. Din punct de vedere al focalizării izoelectrice, principiul izotahoforezei propune o nouă metodă electroforetică de separare a proteinelor, ***focalizarea izotahoforetică***.

Pe scurt, focalizarea izotahoforetică este izotahoforeza cu două caracteristici noi:

- se formează un spectru de mobilitate continuu;
- zonele cu componentele separate sunt imobilizate sau, cel puțin „întârziate".

Principiul izotahoforezei este următorul:

Se consideră o probă formată din 3 specii anionice distincte: A, B și C. Separarea se face într-un tub capilar situat între două rezervoare cu electroliți reprezentând compartimentul anodic (electrolitul frontal) și compartimentul catodic (electrolitul terminal) (vezi

figura.7a). Sub acțiunea câmpului electric fiecare dintre cele trei specii se vor deplasa corespunzător cu mobilitatea sa electroforetică.

Până la ordonarea definitivă în trei zone distincte, sistemul va trece prin etape intermediare, cu zone bine conturate şi zone amestecate (vezi figura 7 b.). În final se obțin trei zone pure care se dispun între faza frontală şi faza terminală.

După terminarea separării distanța între zone şi lățimea lor nu se modifică, sistemul atingând starea staționară. Fiecărei zone îi corespunde o diferență de potențial care compactează zona; în spatele zonei, intensitatea câmpului electric este mai mare iar în față este mai mică, astfel încât un ion în afara zonei va fi obligat să se deplaseze mai repede sau mai încet, până va ajunge în zona sa.

Starea staționară, într-un permanent echilibru dinamic, determină caracteristicile zonelor separate:

- unei zone îi corespund o singură sau mai multe specii ionice cu mobilități electroforetice identice;
- delimitarea zonelor este netă, iar ordinea lor depinde de mobilitatea electroforetică a fiecărei specii ionice;
- concentrația speciei ionice într-o zonă este uniformă şi depinde de compoziția fazei frontale şi de mobilitatea ionului frontal;
- vitezele de deplasare ale zonelor, după ce separarea este completă, sunt egale.

În prezent, izotahoforeza este o metodă analitică avansată fiind comparată din punct de vedere al performanțelor şi aplicațiilor cu cromatografia în fază lichidă.

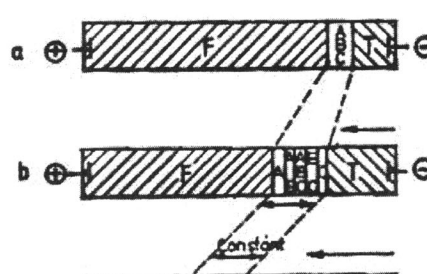


Figura 7. Principiul separării prin izotahoforeză: a)-introducerea probei; b)-separarea intermediară la aplicarea câmpului electric; c)-separarea finală; P- electrolit frontal; T- electrolit terminal

Aspecte analitice fundamentale în izotahoforeză

Datele experimentale obținute prin această metodă sunt fructificate în vederea evaluării unor parametrii fizico-chimici ai compușilor separați, ai electroliților folosiți și ai echilibrelor chimice implicate.

Separabilitatea diferitelor componente a fost investigată la început cu ajutorul unei proceduri bazată pe măsurarea mobilităților efective, iar mai recent prin simulare pe calculator.

În ultimul timp s-au descris atât teoretic cât și experimental, noi sisteme izotahoforetice care diferă de structura de bază clasică.

Alte sisteme fie folosesc mai mulți contraioni, fie în electrolitul frontal se adaugă o cantitate de electrolit terminal, sau electrolitului terminal i se adaugă electrolit frontal, sau ambele posibilități concomitent. De remarcat că în aceste sisteme, numărul componentelor care migrează izotahoforetic descreşte dar creşte selectivitatea separării.

Determinarea cantitativă a componentelor separate este în directă corelaţie cu lăţimea zonei şi influenţează limita de detectare. Un rol esenţial în reglarea clarităţii lăţimii îl are fluxul electroosmotic, iar pentru a reduce efectele sale fie se folosesc agenţi tensioactivi fie se creşte concentraţia, fie se scade pH-ul fazei frontale.

Aparatură – cea mai importantă parte a unui aparat de izotahoforeză este coloana izotahoforetică alcătuită din: un tub capilar pentru separare, un sistem de injectare a probelor, două compartimente pentru electroliţi şi un sistem de detectare; acestea sunt fie module separate, fie bloc compact. Indiferent de tip, coloana este termostatată.

Sistemul de injectare a probelor trebuie să fie foarte fin şi foarte precis pentru a asigura reproductibilitatea aplicării probelor între electrolitul frontal şi cel terminal, de care, în ultimă instanţă, depinde acurateţea determinării cantitative. Cu sistemele actuale se pot injecta volume de la câţiva nL (10^{-7}) până la 30 μL sau chiar 1 mL.

Tubul capilar de separare este confecţionat din sticlă, cuarţ sau teflon; se folosesc mai multe tipuri de capilare. Diametrul interior este de 0,4-0,6 mm iar cel exterior de 0,7-1,0 mm. Lungimea tubului capilar depinde de complexitatea probelor ce urmează a fi separate; capacitatea de separare creşte cu lungimea capilarului, dar, în acelaşi timp, cresc şi valoarea tensiunii electrice şi timpul necesar separării.

Problema a fost rezolvată printr-o soluţie elegantă numită „cascadă de concentraţie": tubul capilar este împărţit în două unităţi virtual independente, care pot fi considerate ca două coloane conectate.

Prima unitate, unitatea de „preseparare", cu diametrul interior de 0,8 mm, este prevăzută cu un detector automat şi cu o bifurcare la care se conectează a doua unitate, unitatea analitică, cu diametrul interior de 0,2 mm. Sistemul face

posibilă folosirea de electroliți frontali diferiți, în cele două unități.

Pentru analiza directă a componentelor în urme se folosesc tuburi capilare în care se pot separa volume mari de probă (până la 1 mL).

Sistemul de detectare. Primul tip de detector a fost detectorul termometric – un termocuplu – cu o putere de rezoluție mică. Ulterior au apărut detectoarele de contact universale care sunt încorporate în capilarul de separare măsurând, fie rezistența electrică, fie gradientul de potențial. În această categorie, a detectoarelor universale intră și detectorul multicanal. În prezent, cel mai folosit este detectorul fotometric cu absorbție selectivă în UV. Un proces semnificativ îl constituie apariția detectoarelor fluorimetrice, radiometrice și electrochimice, caracterizate prin sensibilitate și specificitate înalte.

Compartimentele electrozilor. Sunt confecționate din plexiglas, sticlă sau teflon. Conectarea compartimentului corespunzător electrolitului frontal cu tubul capilar se face prin intermediul unei membrane semipermeabile (celofan), iar a compartimentului electrolitului terminal printr-o supapă multicanal. Atunci când se lucrează cu soluții tampon cu pH-uri ridicate, pentru a se evita interferența cu CO_2 din atmosferă, compartimentele electrozilor sunt închise.

Instalații comerciale. Actualmente se folosesc 3 tipuri de analizoare izotahoforetice analitice capilare și un aparat pentru izotahoforeză în flux liber continuu. Unul din aceste analizoare analitice este *Tachophor 2127* (LKB, Suedia). Acesta este echipat cu tuburi capilare de separare din teflon cu lungimea de 230-800 mm și diametrul interior de 0,5 mm, termostatate în domeniu 3-29 ^{0}C, detector fotometric în UV și un redresor care furnizează o tensiune stabilizată de

30 kV la o intensitate a curentului electric de până la 500 μA.

IP-IB (Shimadzu, Japonia) este dotat cu tuburi capilare din teflon cu lungimi cuprinse între 200-1000 mm şi cu un diametru interior de 0,5 mm, posibilităţi de termostatare între 5-20 ^{0}C, redresor de 15 kV / 500 μA şi detector fotometric în UV.

IP-2A (Shimadzu, Japonia) este echipat cu două tipuri de tuburi capilare (0,5 şi 1 mm diametrul interior) şi două tipuri de detectoare: fotometric în UV şi universal de contact. Se foloseşte acelaşi redresor ca la IP-IB.

Pentru izotahoforeză în flux liber continuu se foloseşte aparatul *Elphor V A P 21* (Bender & Hobein, Germania) cu un compartiment de separare variabil 50 × 250 × 0,3 mm sau 200 × 250 ×1 mm, reprezentat de două plăci de sticlă cu conductibilitatea termică ridicată. Proba este introdusă continuu cu o viteză între 0,3 şi 100 mL/oră. Lucrează în domeniul 750 V/1330 mA - 3000 V/330 mA, cu posibilităţi de termostatare între 4 şi 25^0 C. Aparatul este dotat cu un detector fotometric (Elphor Scan), iar controlul automat şi evaluarea separării se face cu ajutorul unui microcomputer Apple II.

Aplicaţiile izotahoforezei. Izotahoforeza are numeroase aplicaţii în diferite domenii de activitate; este folosită pentru separarea atât a substanţelor organice cât şi a celor anorganice. În continuare redăm câteva din cele mai recente aplicaţii.

În lichidele biologice pot fi determinaţi anionii anorganici, metalele grele, acizii organici, aminoacizii, oligopeptidele, purinele, pirimidinele, nucleozidele, nucleotitele sau chiar proteinele din lichidul cefalorahidian în diferite stări patologice: scleroză în plăci, neurinom, meningită, meningoencefatiltă, leucemie acută, etc., determinări deosebit de importante pentru laboratorul clinic.

Izotahoforeza se foloseşte în industria farmaceutică atât pentru studierea produselor intermediare cât şi a celor finite. Unele medicamente sunt determinate prin această tehnică până la 1,6 nmoli, altele cum sunt anestezicile locale până la 1,8 nmoli.

În industria alimentară, izotahoforeza se foloseşte pentru analiza acizilor organici, a conservanţilor şi a aromelor.

Izotahoforeza se foloseşte cu succes în analiza mediului ambiant (erbicide, fenol, nitraţi, fluoruri, metale grele, etc.).

În industria chimică metoda se foloseşte pentru analiza materiilor prime şi a produselor finite. De asemenea metoda se utilizează ca metodă de analiză în enzimologie, în chimia proteinelor şi nucleotidelor precum şi în alte domenii de cercetare.

Electroforeza de înaltă performanţă

Metoda („high-performance electrophoresis") a fost introdusă de Hjerten în 1983 fiind echivalentul cromatografiei de lichide de înaltă performanţă. Se poate efectua atât în mediu liber cât şi în mediu stabilizant (geluri). Se caracterizează printr-o rezoluţie de separare foarte bună, timp scurt de migrare, sensibilitate înaltă, şi identificare rapidă a fracţiunilor.

Durata separării se poate reduce prin utilizarea unei coloane scurte şi/sau a uni câmp electric de intensitate mare bine controlată.

În absenţa unui sistem de răcire, se folosesc coloane construite din material cu o conductivitate termică mare şi cu pereţi foarte subţiri (0,1-0,2 mm). Diametrul interior al coloanei este cuprins între 0,05 şi 0,3 mm.

Sensibilitatea depinde de sistemul de detectare. Cele mai bune rezultate s-au obţinut cu un detector staţionar în UV. Probele în cantităţi cuprinse între 0,01 şi 1 μg se aplică în partea superioară a gelului (poliacrilamidă sau agaroză).

În figura 8 este prezentată separarea unui amestec de acizi carboxilici aromatici prin această tehnică. Experimentul s-a efectuat într-o soluţie tampon (pH =8,6) la o intensitate a câmpului electric de 100 V/cm şi a curentului electric de 0,6 mA.

Distanţa dintre locul de aplicare al probei şi detector (distanţa de migrare) a fost de 8 cm iar timpul de migrare 10 minute. S-au utilizat un tub de sticlă cu diametrul interior de 0,15 mm în gel de poliacrilamidă iar înregistrarea s-a efectuat la 265 nm.

Atunci când metoda se efectuează în mediu liber trebuie luate măsuri pentru prevenirea electroosmezei şi a convecţiei. Prima poate fi eliminată prin acoperirea suprafeţei interioare a tubului de migrare cu un strat foarte subţire de metilceluloză sau prin includerea acestui polimer în soluţia tampon de migrare.

Convecţia intervine numai atunci când se urmăreşte separarea compuşilor de masă moleculă mare (proteine, acizi nucleici, virusuri şi bacterii). În acest caz, convecţia poate fi complet eliminată dacă tubul orizontal de electroforeză este rotit încet în jurul axei longitudinale cu o viteză de 40 rotaţii/minut.

În electroforeza de înaltă performanţă, pot fi detectate numai componentele care se deplasează, datorită detectorului staţionar. Metoda prezintă o serie de avantaje faţă de metodele convenţionale: având în vedere timpul scurt de migrare, dar şi volumele mici de probe (0,01-1 μL), această metodă se recomandă în special pentru analize preliminare. Trebuie remarcat, de asemenea, că electroforeza de înaltă performanţă este în multe privinţe

apropiată şi poate fi chiar considerată un caz particular de izotahoforeză.

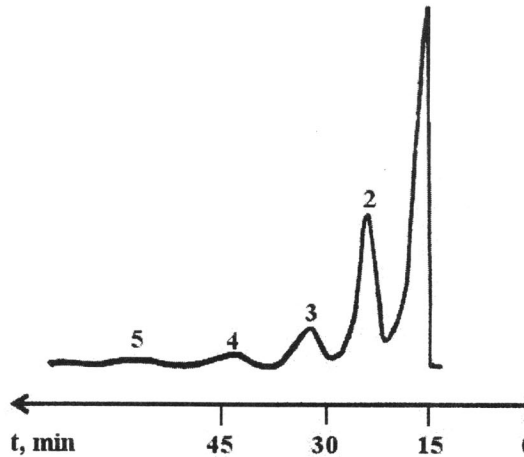


Figura 8. Electroforeza de înaltă performanţă aplicată la separarea acizilor carboxilici aromatici în gel de poliacrilamidă (cantitatea totală de probă 0,01μg, iar timpul de migrare 10 minute:

1.- acid tereftalic;
2.- acid benzoic;
3.- acid 4-hidroxibenzoic;
4.- acid hidroxi-3-metoxibenzoic;
5.- acid naftilacetic

Prin electroforeză de înaltă performanţă fie în gel de agaroză fie în gel de poliacrilamidă, au fost separate şi analizate proteinele. În figura 9 este ilustrată separarea albuminei serice din bovine în gel de poliacrilamidă. Diferitele fracţiuni au fost evidenţiate prin colorare.

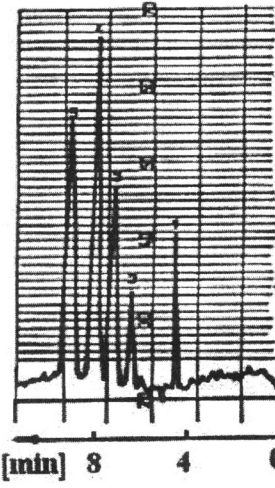


Figura 9. Separarea albuminei serice bovine (0,1 μg) prin electroforeză de înaltă performanță în gel de poliacrilamidă:

1.- monomer;
2.- dimer;
3.- trimer;
4.- tetramer;
5.- penzamer

Ulterior, Hjerten şi Zhu au pus la punct o versiune micropreparativă a electroforezei de înaltă performanță; de asemenea, au adaptat echipamentul folosit pentru electroforeza de înaltă performanță la focalizarea izoelectrică, reuşind separări rapide şi reproductibile în capilare de sticlă cu diametrul interior de 0,2 mm, grosimea peretelui de 0,1 mm si lungimea de 120 mm.

14. FRACȚIONAREA PRIN CURGERE ÎN CÂMP

Este o metodă de separare a speciilor macromoleculare, respectiv a particulelor cu M cuprins între 10^3 și 10^{12} corespunzător dimensiunilor de la 10^{-3} la 1 μm. Deoarece migrarea diferențială se bazează pe retenții selective cauzate de forțe externe și nu prin distribuția între două faze, metoda nu este cromatografică, deși prezintă multe asemănări. Spre deosebire de cromatografie, fracționarea prin curgere în câmp se desfășoară într-o singură fază, neexistând nici fază staționară nici suport granular pentru reținerea unui lichid aderent. Separarea are loc într-un canal prin care curge o fază fluidă care antrenează proba.

14.1. PRINCIPIUL METODEI

Fracționarea prin curgere în câmp este o metodă de eluție ca și în cromatografie, separarea având loc în timpul curgerii printr-o coloană îngustă. Fluxul de lichid purtător are un profil de curgere mai mult sau mai puțin parabolic, antrenând, totodată, proba de-a lungul canalului. Perpendicular pe axa canalului acționează un câmp extern de forțe sau un gradient, care obligă solutul să se apropie de peretele inferior al coloanei, pe lângă care formează un strat subțire. Pentru fiecare specie chimică distinctă media grosimii acestui strat este dependentă de tăria cuplării între câmp și specie și de coeficienții de difuzie ai fiecărui component în parte.

Dacă acest câmp se cuplează puternic cu specia, stratul moleculelor este strâns comprimat către perete, iar dacă specia difuzează în mod rapid, ea iese de sub influența

câmpului şi stratul se extinde. Speciile constituite din particule mici prezintă difuzibilităţi superioare şi vor fi primele antrenate spre ieşirea din canal. Cele cu difuzibilităţi mai mici, adică particulele mari şi greoaie, vor sta strâns lipite de peretele canalului într-un strat aproape compact ceea ce are drept consecinţă o deplasare lentă şi evacuarea lor cu întârziere. Pe aceasta se bazează retenţia selectivă, care produce un spectru de eluţie format din picuri corespunzătoare particulelor ale căror dimensiuni sau mase merg crescător de la cele mici la cele mari.

Câmpul sau gradientul care provoacă formarea stratului de solut poate avea orice provenienţă cu condiţia să acţioneze producând o deplasare laterală selectivă a moleculelor din probă.

Ţinând seama de posibilităţile de interacţiune ale câmpului, s-au stabilit următoarele tehnici:

- fracţionarea prin sedimentare realizată sub acţiunea unor forţe centrifugale sau gravitaţionale;
- fracţionarea sub acţiunea unui flux transversal de solvent, care forţează un transport lateral selectiv;
- fracţionarea sub influenţa unui gradient de temperatură, care induce diferite difuzii termice;
- fracţionarea în câmp electric, care se bazează pe diferenţa între mobilităţile electroforetice.

Metoda se aplică cu precădere în analiza produselor polimerice. Din studiile întreprinse asupra amestecurilor polimere s-au desprins următoarele condiţii pentru aplicarea procedeului:

- amestecul de analizat trebuie să fie solubil sau dispersabil într-un solvent compatibil cu sistemul aplicat;
- câmpul implicat trebuie să fie suficient de puternic pentru a interacţiona cu solutul, obligându-l să se aglomereze într-un strat îngust către peretele inferior.

15. TOPIREA ZONALĂ

Include un ansamblu de metode de mari performanţe care controlează prezenţa şi proporţia impurităţilor dintr-un produs solid cristalizat. Acest procedeu are drept scop obţinerea unor materiale de puritate avansată cu destinaţii speciale, prepararea unor etaloane pentru analiza chimică instrumentală, prepararea unor produse farmaceutice sau biologice ultrapure, fracţionarea unor polimeri, separarea unor substanţe cu proprietăţi asemănătoare, etc.

În chimia analitică se foloseşte ca mijloc de separare şi concentrare a componenţilor aflaţi în urme.

15.1. PRINCIPIUL METODEI

Procedeul topirii zonale constă din deplasarea lentă a unei zone topite înguste de-a lungul unei bare relativ lungă de probă solidă. Zona îngustă de topitură parcurge lingoul de la un capăt la celălalt, provocând redistribuirea impurităţii incluse iniţial în întreaga masă a solidului. În mod schematic procedeul se reprezintă astfel:

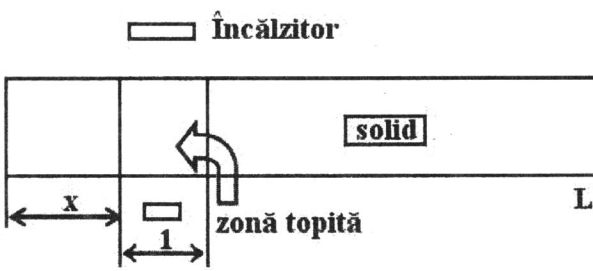


Figura 1. Procedeul topirii zonale

Sub influenţa unui încălzitor care se deplasează cu viteză mică de-a lungul barei cilindrice de lungime L, o zonă topită a cărei lăţime corespunde încălzitorului, l, străbate distanţa x. Zona topită este cuprinsă între două interfeţe S-L, una de topire în faţă pe direcţia deplasării şi cealaltă posterioară, de solidificare. Interfaţa de solidificare este sediul principal al procesului de separare, iar redistribuirea impurităţii în materialul cristalizat are loc datorită diferenţei de comportament la această interfaţă.

Impuritatea este acceptată sau respinsă în zona topită în funcţie de influenţa pe care o manifestă asupra p_t al componentului principal din probă. Astfel, dacă coboară p_t, impuritatea este preferată în topitură, concentrându-se în lichid, sărăcind totodată faza solidă învecinată. În cazul invers, în care impuritatea ridică p_t, ea se concentrează în partea solidă. Deci impuritatea va migra în acelaşi sens sau în sens contrar în care se deplasează zona topită, concentrându-se la unul sau la celalalt capăt al lingoului. Gradul de separare creşte cu numărul de treceri ale zonei încălzite.

Din punct de vedere al mecanismului, metoda topirii zonale este o adevărată extracţie S-L a impurităţii sau a componentului pur. Se pot purifica prin această metodă substanţe ale căror puncte de topire variază într-un domeniu foarte larg, de la -100 ^{0}C la 4000 ^{0}C, probele putând varia de la câteva kg până la câteva mg.

Procedeul nu poate fi aplicat materialelor formate din compuşi volatili sau care sublimează, se alterează, au temperaturi înalte de fuziune sau care prin încălzire devin foarte reacţionabili.

Comparativ cu alte procedee fizice, metoda topirii zonale prezintă unele avantaje, deoarece nu necesită reactivi sau solvenţi, se poate lucra cu cantităţi foarte mici sau mari şi se poate uşor automatiza.

15.2. DIAGRAME DE FAZE S-L

În principiu, topirea zonală se bazează pe diferența de compoziție între un lichid conținând cel puțin doi componenți și cristalele care se separă din acest lichid. În funcție de sistem, cristalele separate pot fi constituite din componenți puri sau din soluții solide. Datele experimentale sunt reprezentate pe diagrame care înregistrează variația compoziției (pe abscisă) în funcție de punctele de solidificare (pe ordonată).

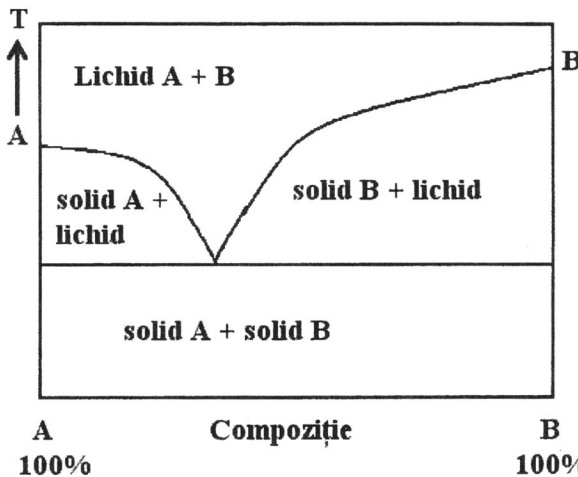
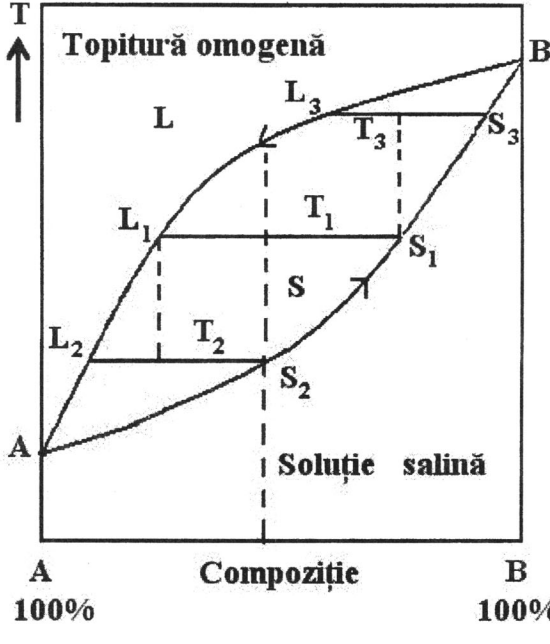


Figura 2. Diagrame T-compoziție cu punct eutectic

Mixtura de solide A și B coexistă în echilibru cu soluția în punctul C, numit punct eutectic. Substanțele care formează diagrame de acest tip se pot separa cel mai ușor

prin topirea zonală, dacă au o compoziţie care diferă suficient de mult de aceea a eutecticului.

Eficienţa separării depinde de concentraţia iniţială, de lungimea zonei topite, de lungimea barei şi de poziţia punctului eutectic. Mai frecvente sunt cazurile când le corespund diagrame pentru soluţii solide omogene indiferent de compoziţie. Pentru un sistem binar A-B există două cazuri: a) când B are $p_t > p_f$; Ab) când B are $p_t < A$.



Cazul (a)

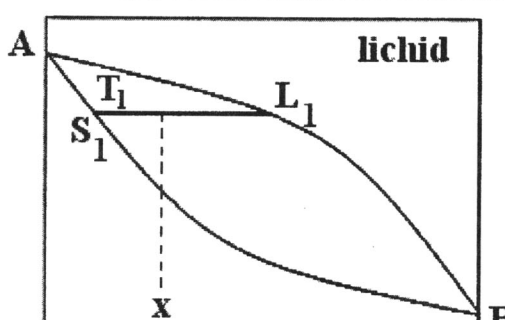


Figura 3. Diagrame T-compoziţie

În primul caz (a) presupunând că un amestec x de compoziţie omogenă formată din doi componenţi se încălzeşte la temperatura T_1 se va obţine o topitură de compoziţie L_1 cu o parte solidă de compoziţie S_1.

Dacă faza lichidă se răceşte la T_2 va prezenta o solidificare parţială corespunzând unei compoziţii S_2, partea lichidă având acum compoziţia L_2. Pe de altă parte, soluţia solidă de compoziţie S_1 încălzită la T_3 se va topi parţial (compoziţie L_3) rămânând un solid de compoziţie S_3. Prin urmare, partea lichidă va fi continuu îmbogăţită în component A, iar partea solidă în component B.

În celalalt caz (b) solidul de compoziţie x încălzit la temperatura T_1 se va separa într-o parte lichidă mai bogată în component B (compoziţie L_1) şi o parte solidă mai concentrată în A (compoziţie S_1).

Dacă componentul predominant este A, iar impuritatea este B se vor forma cristale mixte (soluţii solide) cu punct de fuziune mai coborât datorită lui B.

Impuritatea se concentrează în zona topită, eliberând partea solidă, care astfel se purifică. O nouă trecere a zonei topite va avea drept consecință o nouă purificare a solidului prin antrenarea impurității cu topitura. După n treceri ale zonei topite de-a lungul probei când nu se mai constată nici o deplasare a impurității se poate considera atingerea gradului cel mai înalt de purificare la care se poate ajunge prin aceasta metodă.

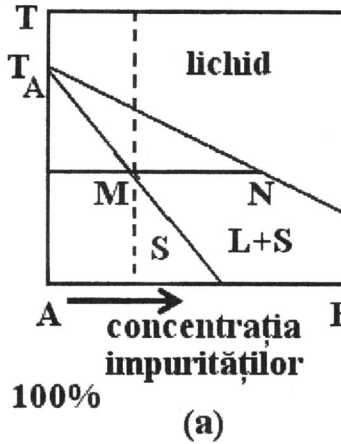
15.3. DISTRIBUȚIA IMPURITĂȚII

Coeficientul de distribuție

Separarea prin topire zonală se bazează pe fenomenul de distribuție a impurității între cele doua faze: solidă și lichidă (topitura). S-a definit raportul concentrației impurității (B) între cele două faze prin „coeficientul de distribuție":

$$D_B = \frac{(C_B)_s}{(C_B)_l} \qquad (1)$$

Dacă impuritatea are coeficient de distribuție subunitar ea se va acumula în topitură, iar dacă este supraunitar ea se va îmbogăți în faza solidă. Cu cât impuritățile vor avea coeficienți de distribuție mai diferiți de unitate, se va obține un grad de purificare mai înalt. În funcție de coeficientul de distribuție se va stabili numărul de treceri ale zonelor de topire în scopul obținerii unor separări cât mai eficace. Pentru determinarea lor se construiesc diagrame de faze în coordonate T-concentrația impurității:



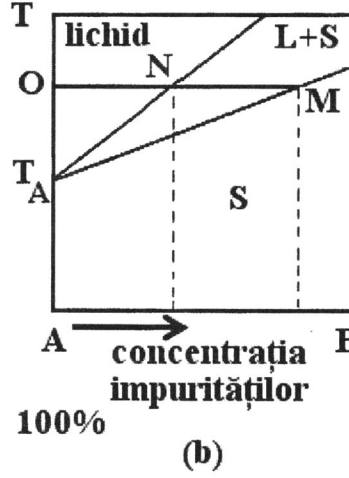


Figura 4. Diagrame de fază T-concentrația impurității

În cazul (a) OM/ON < 1 iar în cazul (b) OM/ON >1.

Concentrația (C) a impurității din faza solidă în funcție de fracțiunea (g) din topitura solidificată este dată de relația:

$$\frac{C}{C_0} = D(1-g)^{D-1} \qquad (2)$$

unde: C_0 = concentrația inițială a impurității.

Variația concentrației relative (C) în funcție de fracțiunea „g" din topitură depinde de coeficientul de distribuție D, după cum rezultă din figură, existând variații net deosebite pentru coeficienții de distribuție supra și subunitari.

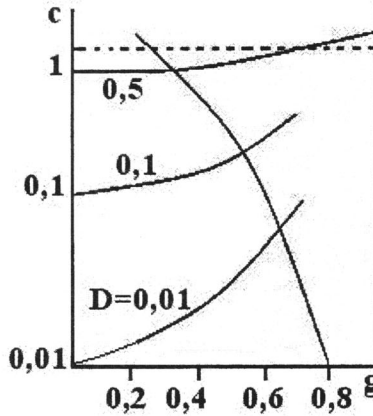


Figura 5. Dependența concentrației relative C în funcție de fracțiunea g

Distribuția impurității este foarte mult influențată de numărul de treceri ale zonei topite, eficiența separării crescând odată cu numărul acestor treceri. Un asemenea calcul este greu de realizat deoarece intervin numeroși parametrii greu de evaluat.

15.4. APARATURA

Topirea zonală ca metodă de separare se poate realiza cu ajutorul unei aparaturi care cuprinde următoarele părți principale:

1. Containerul sau nacela care conține substanța supusă topirii zonale. Aceasta nu trebuie să contamineze proba și să nu dea naștere fenomenelor de aderență.
2. Dispozitivul de încălzire și răcire. Sursa de căldură poate fi o rezistență electrică, încălzitori cu conductori de Al sau Cu, încălzitori cu inducție folosind un generator de înaltă frecvență, radiații sau circulația unor fluide încălzite. Dispozitivul de răcire este constituit din vase Dewar cu aer lichid.
3. Un sistem mecanic care să asigure deplasarea coloanei de purificare sau a sursei de încălzire care să permită mișcări lente și constante sau serii de curse alternative.

S-au realizat aparate ultramicro de topire zonală, de operare rapidă, cu dispozitive automate.

15.5. APLICAȚII

Metodele de purificare pot fi considerate concomitent ca metode de separare și de concentrare. Aria de aplicare a metodei este foarte extinsă și diversificată. Procedeul a permis obținerea unor elemente ultrapure folosite ca semiconductoare, s-au sintetizat aliaje eutectice

multicomponente, s-a obținut creșterea monocristalelor, s-au adus modificări în structura cristalină, etc.

De exemplu, siliciul a fost purificat până la un conținut în impurități de sub 10^{-8} %, aluminiul ajunge la o puritate de 99,999 %, germaniul se obține prin această tehnică ultrapur, putând fi folosit alături de Si la fabricarea tranzistoarelor.

Cuprul se obține de o puritate superioară celui electrolitic. S-au realizat monocristale de: W, Te, Bi. Din punct de vedere analitic au fost realizate o serie de separări ca:

Zr de: Mn, Si, Ni, Mo, Cu;
V de: Mg, Ti, Mo, Cu, Fe, Al, Si;
Ti de: Mn, Si, Fe;
Ga de: Zn;
Nb de: C, Fe, Pb, W.

Pentru purificarea unor substanțe care prezintă dificultăți la operarea prin procedeul topirii zonale clasice (de exemplu: se descompun la încălzire, sublimează, sunt volatile, se oxidează în topitură etc.) se apelează la unele variante ale metodei.

Astfel, prin tehnica de dizolvare-cristalizare zonală, în locul zonei topite care străbate lingoul, se introduce un solvent care trece de-a lungul lui de la un capăt la celălalt, urmând să fie eliminat când ajunge la marginea sistemului.

În timpul deplasării zona de solvent eventual încălzit la o anumită temperatură, colectează impuritățile, lăsând în urmă substanța pură. Cel mai utilizat sistem folosește ca solvent apa. În acest mod se purifică NaOH de: PO_4^{3-}; F^-; Cl^-; SO_4^{2-}; CO_3^{2-}.

În alte cazuri, se procedează la aplicarea topirii zonale în mod indirect, la compuşii substanţei de purificat. Astfel, folosind agenţi de chelatizare, se formează complecşi, care pot prezenta unele avantaje la aplicarea procedeului topirii zonale.

Chelaţii trebuie să fie stabili la tratamente termice sau solubili într-un solvent organic solid, cu rol de a dizolva chelatul metalic în topitură. În acest mod s-a separat Al de Fe (III) în mod cantitativ.

Procedeul topirii zonale se aplică cu succes şi în domeniul compuşilor organici. Astfel au fost purificate următoarele clase: acizi graşi, fenoli, aminoacizi, hidrocarburi polinucleare, amine aromatice, etc.; au fost separaţi compuşi optic activi, au fost preparate prin acelaşi procedeu o serie de produse farmaceutice sau biologice de înaltă puritate.

BIBLIOGRAFIE

1. K. Blan, S.G. King, *Handboolof derivatesfor chromatography*,Heyden, London, 1978.
2. J.M. Bobbitt, *Thin Lyer chromatofraphy*, Reinhold, New York, 1973.
3. T. Braun, G. Ghersini, *Extraction chromatography*, Alad. Kiado, Budapesta, 1975.
4. J. Crommen, B. Fransson, G. Schill, *J. Chromatog.*, **142**, (11), 283, 1977.
5. H. Determann, *Gel chromatography*, Springer-Verlag, New-YORK, 1979.
6. J.C. Giddings, S.R. Fischer, M.V. Myers, *Întern. Lab.*, mai-iunie,15, 1978.
7. J.C. Giddings, M.V. Myers, C. Lin, M. Martin, *J. Chromatog,* **142**, 11, 23, 1977.
8. J.C. Giddings, R.A. Keller, *Advances in chromatography*, Dekker, New York, 1970.
9. J.C. Giddings, *Dynamics of chromatography*, Part. I, Dekker, New York, 1975.
10. E.Groshila, Bondel Stationary phasesin chromatography, Ann. Arbor Sci., Publ. Michigan, 1974.
11. E. Heltmann, *Chromatography*, Reinhold, New York, 1977.
12. F. Hellferich, *Ion exchange*, McGraw-Hill, New-York, 1972.
13. C. Horvath, W. Melander, *Intern. Lab.*, nov.-dec., 11,1978.
14. J.Inczedy, *Analyticalapplicationof complexequilibria*, Akad. Kiado, Budapesta, 1976.
15. E. Jercan, *Analiza cromatografică*, Ed. Academiei, Bucureşti,1982.
16. E. Jercan, *Metode analitice de separare*, Centrul de multiplicare Bucureşti, 1978.

17. E. Jercan, I.C. Cazacu, Ş. Moldoveanu, V. Dumitrescu, L. Vlădescu, F. Dăneţ, D. Cruceru, *Îndrumar pentru lucrări practice-metode analitice de separare*, Centrul de multiplicare Bucureşti, 1978.
18. E. Jercan, *Metode de srparare în chimia analitică*, Editura Tehnică, Bucureşti, 1983.
19. B.L. Karger, J.R. Gant, *J. Chromatog.Sci.*, **123**, 65, 1976.
20. C.T. Kenner, *Instrumental in separationanalysis*, A Bell Howell Comp., Coulumbus Ohio, 1973.
21. J.J. Kirkland, *Modern practice of liquid chromatography* Wiley-Interscience, New-York, 1971.
22. C. Liteanu, S. Gocan, T. Hodişan, H. Naşcu, *Cromatografia de lichide*, Ed. Ştiinţifică, Bucureşti, 1974.
23. G.E. Baiulescu, *Metode de separare în chimia analitică*, I.C.C. Chim., Centrul de documentare al industriei chimice şi petroliere, Bucureşti, 1972.
24. G.E. Baiulescu, T. Năşcuţiu, *Metode fizice de analiză a urmelor*, Ed. Tehnică, Bucureşti, 1974.
25. M. Myers, K.D. Kaldwell, J.C. Giddings, *Separation Sci*, **9**, 47, 1974.
26. N. Necula, A. Micu, V. Marinoiu, *Cromatografe de proces*, Ed. Tehnică, Bucureşti, 1980.
27. S.E. Perry, J.C. van Oss, E. Groshka, *Separation and purification methods*, M. Dekker, New-York, 1974.
28. H. Purnell, *New developments in gas chromatography*, Wiley-Interscience, New-York, 1973.
29. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, *Introduction in modern liquid chromatography*, Wiley-Interscience, New-York, 1974.
30. P.P.W. Scott, *Contemporany liquid chromatography*, Wiley-Interscience, New-York, 1976.

31. V. Tamaş Pelloni, F. Iohan, *Cromatografia în strat subţire*, Ed. Tehnică. Bucureşti, 1971.
32. C. Uglea, *Cromatografia pe gel permeabil*, Ed. Acad., Bucureşti, 1976.
33. H. Weisz, *Microanalysis by the ring-oven technique*, Pergamon Press, 1970.
34. A. Zlatkis, R.E. Kaiser, *HPTLC high performance thin layer chromatography*, Elsevier Sci., Publ. Comp. Amsterdam, 1978.
35. A. Zolotov, N.M. Kuzmin, *Concentrarea prin extracţie* (traducere din limba rusă), Ed. Tehnică, Bucureşti, 1973.
36. G. Mahauzer, M. Haman, *Abrege de chimie analityque*, tome 2: *Methodes de separation*, Ed. Masson, Paris, 1986.
37. J.M. Miller, *Separation methods in chemical analysis*, John Wiley, New-York, 1975.
38. M. Pintea, *Traces Analysis*, John Wiley, New-York, 1981.

ISBN: 973-742-536-7
978-973-742-536-2